

CLINICAL NEUROSCIENCE

70. ÉVFOLYAM



3–4. SZÁM • 2017. MÁRCIUS 30.

IDEGGYÓGYÁSZATI SZEMLE

Procedurális tanulás és konszolidáció autizmus spektrum zavarban (English)

Virág Márta, Janacsek Karolina, Balogh-Szabó Virág, Chezan Júlia,
Németh Dezső

A sportolás és a baleseti agysérülés összefüggései – veszélyek és következmények (Hungarian)

Tamás Viktória, Kovács Noémi, Büki András

Sclerosis tuberosás betegek gondozása (English)

Fogarasi András, Gyorsok Zsuzsanna, Bodó Tímea

A családorvosok alvási apnoéval kapcsolatos ismeretei és attitűdjei. Megvalósul-e az OSAS szűrése a járművezetők egészségi alkalmasságának vizsgálata során? (Hungarian)

Csatlós Dalma, Ferenci Tamás, Kalabay László, László Andrea,
Hargittay Csenge, Márkus Bernadett, Szakács Zoltán, Torzsa Péter
A szkizofrénia multilokusz genetikai vizsgálata az idegfejlődés és az
immunrendszer zavarának oki szerepére utal(hat) (Hungarian)
Pulay Attila József, Koller Júlia, Nagy László, Molnár Mária Judit,
Réthelyi János, a Magyar Schizobank Konzorcium munkatársai
Titán-dioxid nanorészecskék szubakut légúti adagolásával
kiváltott elektrofiziológiai eltérések és általános toxicitás patkányban
(English)

Horváth Tamara, Papp András, Kovács Dávid, Kálomista Ildikó,
Kozma Gábor, Vezér Tünde

Különböző ápolói munkarendek hazánkban és egészségre gyakorolt hatásaik (English)

Fusz Katalin, Tóth Ákos, Varga Bernadett, Rozmann Nóra, Oláh András
Pazopanib indukálta egyoldali posterior reverzibilis encephalopathia
szindróma (English)

Muhsine Beyza Arslan, Arsida Bajrami, Elif Demir, Murat Çabalar,
Vildan Yayla

Procedural learning and its consolidation in autism spectrum disorder (English)

Márta Virág, Karolina Janacsek, Virág Balogh-Szabó, Júlia Chezan,
Dezső Németh

Relationship between sport and traumatic brain injury – risks and sequelae (Hungarian)

Viktória Tamás, Noémi Kovács, András Büki

Surveillance and management of patients with tuberous sclerosis complex (English)

András Fogarasi, Zsuzsanna Gyorsok, Tímea Bodó

Hungarian family physicians' and residents' knowledge of and attitude towards OSAS (obstructive sleep apnea syndrome). Do they screen sleep apnea during the general medical checkup for the driving licence? (Hungarian)

Dalma Csatlós, Tamás Ferenci, László Kalabay, Andrea László,
Csenge Hargittay, Bernadett Márkus, Zoltán Szakács, Péter Torzsa
Multilocus genetic analysis implicates neurodevelopment and
immune system in the etiology of schizophrenia (Hungarian)
Attila József Pulay, Júlia Koller, László Nagy, Mária Judit Molnár,
János Réthelyi, colleagues of the Hungarian SCHIZOBANK Consortium
Electrophysiological alterations and general toxic signs obtained by
subacute administration of titanium dioxide nanoparticles to the
airways of rats (English)

Tamara Horváth, András Papp, Dávid Kovács, Ildikó Kálomista,
Gábor Kozma, Tünde Vezér

Different work schedules of nurses in Hungary and their effects on health (English)

Katalin Fusz, Ákos Tóth, Bernadett Varga, Nóra Rozmann, András Oláh
Pazopanib induced unilateral posterior reversible encephalopathy
syndrome (English)

Muhsine Beyza Arslan, Arsida Bajrami, Elif Demir, Murat Çabalar,
Vildan Yayla



CLINICAL NEUROSCIENCE

70. ÉVFOLYAM



3–4. SZÁM • 2017. MÁRCIUS 30.

IDEGGYÓGYÁSZATI SZEMLE

OFFICIAL JOURNAL

of the

Hungarian Neurological Society,
Hungarian Neurosurgical Society,
Hungarian Society of Clinical Neurophysiology,
Hungarian Society of Child Neurology,
Hungarian Society of Neuroradiology,
Hungarian Epilepsy League,
Horányi Béla Hungarian Clinical Neuroscience Society,
Hungarian Stroke Society,
Hungarian Neuroscience Society.

•

Magyar Neurológiai Társaság,
a Magyar Idegsebészeti Társaság,
a Magyar Klinikai Neurofiziológiai Társaság,
Magyar Gyermekneurológiai Társaság,
a Magyar Neuroradiológiai Társaság,
a Magyar Epilepszia Liga,
a Horányi Béla Klinikai Idegtudományi Társaság,
a Magyar Stroke Társaság
és a Magyar Idegtudományi Társaság

HIVATALOS LAPJA.

www.elitmed.hu

L



M

Chief Editor • Főszerkesztő
Rajna Péter Budapest

Managing Editor • Felelős szerkesztő
Tajti János Szeged

Editors • Szerkesztők

Bodosi Mihály Szeged
Janka Zoltán Szeged
Vécsei László Szeged

Ivan Bodis-Wollner New York
György Buzsáki Newark
Balázs Gulyás Stockholm
László Solymosi Würzburg

Assistant Editor • Szerkesztőségi titkár
Kállai Éva Szeged

Editorial Board •
Szerkesztőbizottság

Banczerowski Péter Budapest
Bereczki Dániel Budapest
Csiba László Debrecen
Csibri Éva Budapest
Deák György Budapest
Dóczi Tamás Pécs
Elekes Károly Tihany
Folyovich András Budapest
Freund Tamás Budapest
György Ilona Debrecen
Halász Péter Budapest
Kenéz József Budapest
Klauber András Budapest
Komoly Sámuel Pécs
Mechler Ferenc Debrecen
Nagy Zoltán Budapest
Nyáry István Budapest
Palkovits Miklós Budapest
Szirmai Imre Budapest
Takáts Annamária Budapest
Tringer László Budapest

International Advisory Board •
Nemzetközi tanácsadó testület

Alexander A. Borbély Zürich
Maurice Choux Marseilles
Karl Ekblom Stockholm
Franz Gerstenbrand Wien
Georg Gosztanyi Berlin
Andrew Kertesz London, Ontario
Carl Hermann Lücking Freiburg
Fritz Magerl St. Gallen
Jerzy Majkowski Warsaw
Joseph B. Martin Boston
Hans-Jürgen Möller München
Frank Clifford Rose London
Hermann Stefan Erlangen
Arthur D. Steffee Cleveland
Karsten Voigt Tübingen

Regional Editors •
Regionális szerkesztők

Csépány Tünde Debrecen
Janszky József Pécs
Kamondi Anita Budapest
Szok Délia Szeged

Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience
havonta megjelenő szakfolyóirat
Impakt faktor: 0,376 (2015)

ISSN 0019-1442

Mailing address • A szerkesztőség postacíme
H-6725 Szeged, Semmelweis u. 6.
Telefon: (36-62) 545-355; fax: (36-62) 545-597,
e-mail: tajti.janos@med.u-szeged.hu

A Literatura Medica Kiadó az Ideggyógyászati
Szemlében közölt hirdetések tartalmáért nem vállal
felelősséget.

Előfizetési díja egyéni előfizetők részére: 7900 Ft/év
Intézmények részére: 12 000 Ft+áfa/év
Támogatói előfizetés, amely akár intézmény, akár
magánszemély által történhet, és a lap fejlesztését szolgálja:
minimum 15 000 Ft+áfa/év

Csak online előfizetés:
Intézményi 9000 Ft+áfa/év

Egyéni bruttó 6000 Ft/év

A lap egy példánya bruttó 2000 Ft

Kérjük, banki átutalással a 10404089-40810913 számú
bankszámlára utalja át az előfizetési díjat.

© Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience
Minden jog fenntartva.



Kiadja és terjeszti: **LITERATURA MEDICA**
ANNO 1990

a LifeTime Media Kft. egészségügyi divíziója

1021 Budapest, Hűvösvölgyi út 75/A

Postacím: 1539 Budapest, Pf. 603

Telefon: (36-1) 316-4556, (36-1) 316-4598,

fax: (36-1) 316-9600, e-mail: litmed@lam.hu

Felelős vezető: Cserni Tímea ügyvezető igazgató

A kiadó munkatársai:

Kiadói szerkesztő: Brys Zoltán

Korrektor: Kulcsár Gabriella

Tervező: Stache Éva

Tördelőszerkesztő: Kellermann József

Nyomdai munkák:

Vareg Hungary Kft.

Felelős vezető: Egyed Márton ügyvezető igazgató

Címlista alapján terjeszti a Magyar Posta Zrt.

1138 Budapest, Dunavirág utca 2–6.

ÖSSZEFOGLALÓ KÖZLEMÉNYEK

Procedurális tanulás és konszolidáció autizmus spektrum zavarban (English)79
Virág Márta, Janacsek Karolina, Balogh-Szabó Virág,
Chezan Júlia, Németh Dezső

A sportolás és a baleseti agysérülés összefüggései – veszélyek és következmények (Hungarian)89
Tamás Viktória, Kovács Noémi, Büki András

Sclerosis tuberosas betegek gondozása (English)97
Fogarasi András, Gyorsok Zsuzsanna, Bodó Tímea

EREDETI KÖZLEMÉNYEK

A családorvosok alvási apnoéval kapcsolatos ismeretei és attitűdjei. Megvalósul-e az OSAS szűrése a járművezetők egészségi alkalmasságának vizsgálata során? (Hungarian)105
Csatlós Dalma, Ferenci Tamás, Kalabay László,
László Andrea, Hargittay Csenge, Márkus Bernadett,
Szakács Zoltán, Torzsa Péter

A szkizofréria multilokus genetikai vizsgálata az idegfejlődés és az immunrendszer zavarának oki szerepére utal(hat) (Hungarian)115
Pulay Attila József, Koller Júlia, Nagy László,
Molnár Mária Judit, Réthelyi János, a Magyar
SCHIZOBANK Konzorcium munkatársai

Titán-dioxid nanorészecskék szubakut légúti adagolásával kiváltott elektrofiziológiai eltérések és általános toxicitás patkányban (English)127
Horváth Tamara, Papp András, Kovács Dávid,
Kálomista Ildikó, Kozma Gábor, Vezér Tünde

Különböző ápolói munkarendek hazánkban és egészségre gyakorolt hatásai (English)136
Fusz Katalin, Tóth Ákos, Varga Bernadett, Rozmann Nóra,
Oláh András

ESETISMERTETÉS

Pazopanib indukálta egyoldali posterior reverzibilis encephalopathia szindróma (English)140
Muhsine Beyza Arslan, Arsida Bajrami, Elif Demir,
Murat Çabalar, Vildan Yayla

REVIEW ARTICLES

Procedural learning and its consolidation in autism spectrum disorder (English)79
Márta Virág, Karolina Janacsek, Virág Balogh-Szabó,
Júlia Chezan, Dezső Németh

Relationship between sport and traumatic brain injury – risks and sequelae (Hungarian)89
Viktória Tamás, Noémi Kovács, András Büki

Surveillance and management of patients with tuberous sclerosis complex (English)97
András Fogarasi, Zsuzsanna Gyorsok, Tímea Bodó

ORIGINAL ARTICLES

Hungarian family physicians' and residents' knowledge of and attitude towards OSAS (obstructive sleep apnea syndrome). Do they screen sleep apnea during the general medical checkup for the driving licence? (Hungarian)105
Dalma Csatlós, Tamás Ferenci, László Kalabay,
Andrea László, Csenge Hargittay, Bernadett Márkus,
Zoltán Szakács, Péter Torzsa

Multilocus genetic analysis implicates neurodevelopment and immune system in the etiology of schizophrenia (Hungarian)115
Attila József Pulay, Júlia Koller, László Nagy,
Mária Judit Molnár, János Réthelyi, colleagues of the
Hungarian SCHIZOBANK Consortium

Electrophysiological alterations and general toxic signs obtained by subacute administration of titanium dioxide nanoparticles to the airways of rats (English)127
Tamara Horváth, András Papp, Dávid Kovács,
Ildikó Kálomista, Gábor Kozma, Tünde Vezér

Different work schedules of nurses in Hungary and their effects on health (English)136
Katalin Fusz, Ákos Tóth, Bernadett Varga, Nóra Rozmann,
András Oláh

CASE REPORT

Pazopanib induced unilateral posterior reversible encephalopathy syndrome (English)140
Muhsine Beyza Arslan, Arsida Bajrami, Elif Demir,
Murat Çabalar, Vildan Yayla



A kiadvány a Magyar Tudományos Akadémia támogatásával készült.

Lapszámunk hirdetői:

Valeant Pharma Magyarország Kft. (76. oldal), UCB Magyarország Kft. (88. oldal), Budapesti Alvásközpont (104. oldal), Merck Kft. (114. oldal), Würwag Pharma Kft. (2. borítóoldal), Magyarország Átfogó Egészségügyi Szűrőprogramja (3. borítóoldal), Magyar Nemzeti Galéria (4. borítóoldal)

A folyóiratot az MTMT indexeli és a REAL archiválja.

A folyóirat a következő adatbázisokban szerepel/journal indexed and abstracted in:

Science Citation Index Expanded (SciSearch®), Neuroscience Citation Index®, Journal Citation Report/Science Edition, ISI Web of Science, MEDLINE, Index Copernicus, SCOPUS, Scirus, Google Scholar

PROCEDURAL LEARNING AND ITS CONSOLIDATION IN AUTISM SPECTRUM DISORDER

Márta VIRÁG^{1, 2}, Karolina JANACSEK^{2, 3}, Virág BALOGH-SZABÓ⁴, Júlia CHEZAN², Dezső NÉMETH^{2, 3}

¹National Institute of Clinical Neurosciences, Epilepsy Centrum, Budapest

²Institute of Psychology, Eötvös Loránd University, Budapest

³MTA-ELTE NAP B Brain, Memory and Language Research Group, Institute of Cognitive Neuroscience and Psychology, Research Centre for Natural Sciences, MTA, Budapest

⁴Institute of Education, University of Szeged, Szeged



English | <http://dx.doi.org/10.18071/isz.70.0079> | www.elitmed.hu

PROCEDURÁLIS TANULÁS ÉS KONSZOLIDÁCIÓ AUTIZMUS SPEKTRUM ZAVARBAN

Virág M; Janacsek K, PhD; Balogh-Szabó V; Chezan J;
Németh D, PhD

Ideggyogy Sz 2017;70(3-4):79-87.

Children with autism spectrum disorder (ASD) show altered learning and memory. A number of recent studies have debated whether procedural learning in ASD is intact or not. Our aim was to further assess the question of whether the implicit, non-conscious form of procedural learning in ASD children is intact or not, furthermore, how shifts towards a more explicit, attention-demanding task setting can alter this performance. We administered a modified version of the Alternating Serial Reaction Time (ASRT) Task to children with ASD and IQ- and age-matched typically developing (TD) children. The task consisted of alternating blocks of cued (explicit) and uncued (implicit probe) blocks, and was repeated after a 16-hour delay. We found that ASD and TD children showed similar sequence-specific learning in cued explicit blocks, however, on the uncued probe blocks ASD children performed better compared to TD children. After the 16-hour delay both groups showed retention of the previously acquired knowledge. Finally, when we investigated the performance in different parts of the blocks, we found that ASD children did not show an effect of fatigue by the second part of the blocks. Our results suggest that children with ASD have increased implicit procedural learning skills compared to TD children. Differences in cued (explicit) and uncued (implicit) settings indicate that children with ASD are not affected by the lack of explicit instructions in probe blocks, suggesting a resistance for changes in task settings. These findings can help in a more thorough planning of cognitive therapeutic setups for ASD children.

Keywords: autism (ASD), implicit learning, probabilistic learning, basal-ganglia

Az autizmus spektrum zavarban (ASD) szenvedő gyermekekre általában jellemző, hogy eltérő tanulási és emlékezeti funkciókkal rendelkeznek. Az utóbbi években több olyan kutatás is született, amely a különböző tanulási mechanizmusokon belül a procedurális tanulást vizsgálta. A jelen vizsgálat célja, hogy többet megtudjunk arról, hogy az autizmus mint egy atipikus fejlődési zavar esetében hogyan változik a procedurális tanulás implicit, nem tudatos aspektusa és annak konszolidációja. Specifikus kérdésünk, hogy egy explicitebb, figyelemfüggőbb feladati elrendezés mennyiben befolyásolja a teljesítményt. Vizsgálatunkban a procedurális tanulás mérésére az Alternáló Szeriális Reakcióidő Feladat (ASRT) erre a célra módosított változatát használtuk autizmus spektrum zavarban szenvedő, illetve IQ és életkor alapján illesztett, egészséges fejlődésű gyermekeknél. A tesztfelvétel két részletben zajlott: az első ülés délután, a második pedig egy 16 órás késleltetés után, másnap reggel volt. Az eredményeink ép tanulást és konszolidációt mutattak a vizsgálati csoportokban. További eredmény, hogy az autizmus spektrum zavarban szenvedő gyermekek nem mutattak a reakcióidőben mérhető általános fáradási hatást ezen a tanulási feladaton. Eredményeinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az autizmus spektrum zavarban szenvedő gyermekek implicit procedurális tanulási készségei stabilabbak, mint egészséges fejlődésű kortársaiké. A kulcsingerekkel rendelkező (explicit) és ezekkel nem rendelkező (implicit) feladati elrendezések eredményeiből arra lehet következtetni, hogy az autizmus spektrum zavarban szenvedő gyermekek nem váltanak stratégiát a megváltozott feladathelyzet hatására. Eredményeink segíthetnek az autizmus spektrum neurokognitív hátterének megértésében és új terápiás módszerek kidolgozásában.

Kulcsszavak: autizmus (ASD), implicit tanulás, probabilisztikus tanulás, bazális ganglionok

Correspondent: Dezső NÉMETH PhD, Eötvös Loránd University, Institute of Psychology;
1071 Budapest, Damjanich u. 41-43. Phone: (06-1) 461-4500/3665, e-mail: nemethd@gmail.com.
All authors contributed equally to this work.

Érkezett: 2016. november 1. Elfogadva: 2016. december 5.

Dissimilarities between children showing typical development (TD) and children with autism spectrum disorder (ASD) manifest in several layers of everyday functioning in life, such as social interactions, cognitive and motor abilities. Children with ASD have to face a broad spectrum of cognitive impairments, for example, in executive functions, working memory, declarative memory, and attentional skills – functions that involve both frontoparietal and temporal cortices, as well as subcortical structures. These cognitive impairments increase during development¹, and can also be addressed to lower structural and functional cortical connectivity among the affected regions^{2–5}. Interestingly, previous studies found increased striatal volume in ASD compared to healthy controls^{2, 4}. The striatal region of the brain has a key role in numerous cognitive abilities, including procedural learning processes. Our aim in this study was to examine how children with ASD perform on a procedural learning task (with alternating task settings in terms of implicitness), by comparing children with ASD and children with TD in performance and learning strategy.

Human learning is traditionally divided into declarative and procedural learning depending on the content (nature of the material one aims to absorb) or the type of processes learning relies on⁶. Procedural learning is the foundation of skill learning processes. The base of skill learning lies on frequently repeated sequences and repeating patterns. Such skill learning paradigms can have conscious (explicit) instructions but can also occur as a spontaneous and automatic process⁷. The most common experimental setups that measure procedural learning explicitly are finger tapping paradigms, whilst serial reaction time (SRT) type tasks are reliable measures of implicit procedural learning.

Interestingly, some aspects of procedural learning, for example implicit, nonconscious learning of sequences involving the fronto-striatal network seems to be intact or even better in ASD children compared to TD children^{8–11}. According to our knowledge, no experimental setup has aimed at investigating the difference between explicit and implicit learning of sequences in children with ASD within one experimental setup so far. Therefore, the goal of the present study was to compare the two types of experimental setups within the same group of ASD participants. In order to examine this question, we developed an experimental design based on previous studies^{7, 11} using both implicit and explicit sections which are alternatingly mingled between each other.

Over the past decade, a number of studies have

focused on implicit sequence learning in ASD. For instance, *Barnes* and colleagues found that implicit learning of spatial context and temporal sequences is intact for children with ASD⁸. Interestingly, they concluded that although performance was intact, children with ASD showed a more prolonged learning. One possible explanation is that prolonged learning can reflect cognitive inflexibility or even obsessive-compulsive tendencies. Similarly, others showed that the process of implicit sequence learning is intact in children with ASD^{10, 12}, however the specific method they require to acquire such skills is somewhat different compared to healthy controls¹³. Finally, further supporting evidence comes from a meta-analysis⁹ comparing studies using the classical or alternating version of SRT. The aforementioned review points to relatively intact or even superior performance in implicit learning paradigms in the ASD population compared to healthy individuals. In summary, implicit learning of sequences seems to be intact in children with ASD, however the explicit sequence learning abilities of ASD children are still to be unraveled.

Studies focusing on explicit sequence learning show a rather dissociating pattern between ASD and TD children. *Travers* and colleagues used the SRT task to measure motor learning in individuals with ASD and concluded that even though the performance of ASD and TD children is very similar, their learning strategy differs¹⁴. In a later fMRI experiment using the SRT task as well, *Travers* and colleagues¹⁵ found that individuals with ASD showed decreased activation in the right superior parietal lobule (SPL) and right precuneus during learning. Others found decreased connectivity and decreased cerebellar activity in children with ASD during sequence learning¹⁶, however activation patterns in subcortical regions such as the basal ganglia did not differ between healthy individuals and people with ASD in a set of similar learning tasks¹⁷. Therefore one can conclude that the performance of ASD children in an explicit sequence learning task is a less clearly intact compared to an implicit sequence learning task; furthermore, there is a certain divergence in the learning strategy they use and the brain areas involved in explicit sequence learning tasks compared to TD children.

Previous literature has pointed out the dissimilarities in the performance of ASD children in implicit and explicit task settings, leading us to the conclusion that the two task settings should be measured in an integrated task setting with the same group of participants. Thus, our aim was to further assess the question of whether implicit procedural learning of children with ASD is intact or not, fur-

Table 1. Mean of age, IQ and performance of ASD and TD groups on the Listening Span Task, the Counting Span Task and the Digit Span Task

Group	Age	IQ	Listening Span Task	Counting Span Task	Digit Span Task
ASD	11 (3.11)	105.84 (27.82)	2.27 (0.76)	2.87 (0.92)	4.61 (1.10)
TD	12 (2.74)	108.61 (17.68)	2.99 (1.07)	3.38 (1.05)	5.08 (1.18)

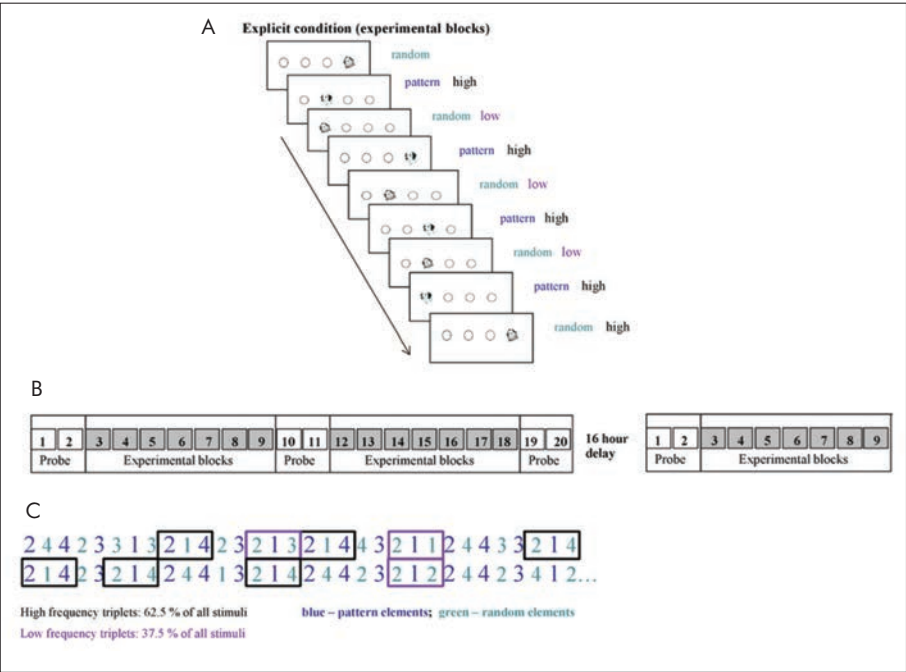


Figure 1. Design of the study. An explicit version of the ASRT task was administered (A) with additional probe blocks (B). The first session consisted of 20 blocks (probe and explicit alternating), the second session (administered 16 hours later during the next morning) consisted of 9 blocks. The ASRT task contains an alternating sequence structure (e.g, 2r4r3r1r, where numbers correspond to the four locations on the screen and the r represents randomly chosen locations), thus some runs of three consecutive elements (called triplets) occur more frequently than others (C)

thermore, how shifts towards a more explicit task setting may alternate this performance. We developed an experimental design which contains both implicit and explicit probabilistic sequence learning blocks that are intermingled during the task. Our first hypothesis was that implicit sequence learning performance of ASD children will be intact or even superior compared to TD children. In case ASD children have difficulties in explicit processes, we predict that explicit shifts in the same task will alter these results by impairing performance of the ASD group compared to the TD group. Our experimental design enables us to take a closer look at whether previous results showing intact implicit sequence learning in the ASD population in fact point to intact implicit learning or intact sequence learning in general.

Materials and methods

PARTICIPANTS

Fourteen children with ASD and fourteen age- and IQ-matched healthy controls participated in the experiment (Table 1). Children with ASD were recruited from the University of Szeged, Faculty of Medicine, Department of Psychiatry, and from public schools in Szeged and neighboring settlements. Children with ASD were diagnosed conducted by psychiatrists from the University of Szeged, Faculty of Medicine, Department of Psychiatry. TD children were recruited from public schools in Szeged and from schools in neighboring settlements. Informed written parental consent and verbal assent of the children

were obtained, participants did not receive financial compensation for their participation.

ALTERNATING SERIAL REACTION TIME TASK (ASRT)

Sequence learning was measured by an altered version of the ASRT task¹⁸ (Figure 1A). The original procedure includes a stimulus (a dog's head), which appears in one of four horizontally arranged empty circles on a computer screen¹⁰. Participants have to press the button that corresponds to the actual location of the stimulus, with the instruction to be as fast and as accurate as possible. The computer is equipped with a special keyboard, which only contains four heightened keys (Z, C, B, M on a QWERTY keyboard) necessary for responding. These keys correspond to the target circles appearing on the

computer screen. Stimuli are presented in blocks of 85 stimuli, from which the first five button presses are random for the purpose of practicing. Practice trials are followed by an eight element alternating sequence (e.g., 2r4r3r1r, where numbers represent the four circles shown on the screen, and r represents the random elements between the target elements). This sequence is repeated ten times in a block.

In the current version of the ASRT task, blocks were organized into explicit and implicit blocks (**Figure 1B**): Blocks 1–2, 10–11 and 19–20 were implicit, while Blocks 3–9 and 12–18 were explicit^{7, 10}. In the implicit (uncued probe) blocks, participants were informed that the main aim of this task was to find out how extended practice affects performance on a simple reaction time task and all stimuli appear in a random order in the task. In the instructions we emphasized performing the task as fast and as accurately as they could.

In the explicit (cued experimental) blocks of the task, the regularity was marked by different stimuli for sequence and random elements⁷. In order to maintain the attention and motivation of the children we chose pictures of animals to indicate sequence (a dog's head) and random (a penguin) elements (**Figure 1A**). Participants were informed that penguins always had randomly chosen locations while dogs always followed a predetermined order (part of the pattern). Children were instructed to find the pattern defined by the dogs in order to improve their performance, thus to be faster and more accurate using this sequence information to predict the sequence elements. This way we were able to detect the effects of changes in the instruction on the task performance.

Due to the structure of the sequences in the ASRT task, some triplets or runs of three consecutive elements (events) occur more frequently (high-frequency triplets) than others (low-frequency triplets; **Figure 1C**). For example, in the above illustration, 2_4, 4_3, 3_1, and 1_2 (where “_” indicates the middle element of the triplet) would occur often because the third element (italic numbers) could be derived from the sequence or could also be a random element. In contrast, 2_3 or 2_1 would occur less frequently because in this case the third element could only be random. Note that the final event of high-frequency triplets is thus more predictable from the initial event when compared to the low-frequency triplets [also known as non-adjacent second-order dependency¹⁹. Therefore, before analyzing the data we determined whether each item was the last element of a high- or low-frequency triplet. Overall, there are 64 possible versions of triplets (4³, 4 stimuli combined for three consecu-

tive events) through the task, from which 16 are high-frequency triplets (62.5%), each of them occurring on approximately 4% of the trials, occurring five times more often than the low-frequency triplets. The remaining 37.5% of the trials are low-frequency triplets. Similarly to previous studies using the same task^{10, 18, 20}, two kinds of low-frequency triplets were eliminated: repetitions (e.g., 222, 333) and trills (e.g., 212, 343). Repetitions and trills were low frequency for all participants, and participants often show preexisting response tendencies to them^{21, 22}. By eliminating these triplets, we could ascertain that any high- versus low-frequency differences were due to learning and not to preexisting tendencies.

Previous studies have also shown that as people go further in practicing the ASRT task, they respond more quickly to the high- compared to the low-frequency triplets, revealing sequence-specific learning^{18, 20, 21}. In addition, general skill learning – namely the general increase in speed of responses throughout the task, irrespectively of the triplet types – can also be measured in the ASRT task.

PROCEDURE

There were two sessions in the experiment: a learning phase (Session 1) and a testing phase (Session 2), separated by a 16-hour interval period. The first session was in the afternoon, between 2 and 4 PM, and took approximately 30–35 minutes. The second session was administered the next morning, between 7 and 9 AM.

STATISTICAL ANALYSIS

To compare learning between TD and ASD groups, we first conducted a mixed design ANOVA for the explicit blocks with TRIPLET (high versus low) and BLOCK (3–9; 12–18) as within-subject factors, and GROUP (ASD versus TD) as a between-subject factor. For the implicit blocks we also applied a mixed design ANOVA with TRIPLET (high versus low) and BLOCK (1–2; 10–11; 19–20) as within-subject factors and GROUP (ASD versus TD) as a between-subject factor. Planned comparisons and post-hoc analyses (when needed) were conducted by Fisher's LSD pairwise comparisons.

To measure consolidation between Session 1 and Session 2, we first conducted a mixed design ANOVA with TRIPLET (high versus low) and BLOCK (blocks 19–20 from Session 1 versus blocks 1–2 from Session 2) as within-subject factors and GROUP (ASD versus TD) as a between-subject factor for the probe blocks. Similarly, to

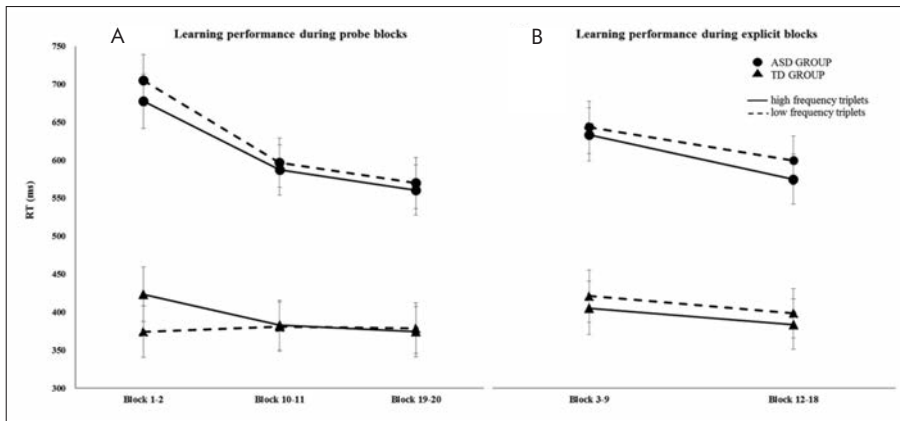


Figure 2. Learning performance in Session 1 of ASD and TD groups in probe (A) and explicit (B) blocks in Session 1. The gap between the solid (high frequency triplets) and the dashed lines (low frequency triplets) indicates sequence-specific learning. Error bars indicate SEM

measure consolidation in the explicit blocks, we applied a mixed design ANOVA with TRIPLET (high versus low) and BLOCK (12–18 from Session 1 versus 3–9 from Session 2) as within-subject factors and GROUP (ASD versus TD) as a between-subject factor.

Finally, differences in fatigue effect between ASD and TD children were examined with a mixed design ANOVA with TRIPLET (high versus low), BLOCK (blocks 3–9; 12–18 for the explicit condition and blocks 1–2; 10–11; 19–20 for the implicit condition) and HALFBLOCK (first and second part of each block) as within-subject factors and GROUP (ASD versus TD) as a between-subject factor.

Results

DID THE ASD GROUP LEARN THE SEQUENCE IN THE PROBE BLOCKS?

The ANOVA showed no significant main effect of TRIPLET ($F(1, 27)=2.528, p=0.124$) in the probe blocks of Session 1. The TRIPLET*GROUP interaction, however, was significant ($F(1, 27)=5.113, p=0.032$), suggesting differences in sequence-specific learning between the ASD and the control group (Figure 2A). While the ASD group exhibited significant learning ($p=0.011$) as they responded faster to high-frequency triplets compared to the low-frequency ones, the control group did not learn the sequence ($p=0.639$).

In addition, the main effect of BLOCK was also significant ($F(1, 27)=49.240, p<0.001$): participants

showed general speed-up during the task, irrespectively of triplet types. The significant BLOCK*GROUP interaction ($F(1, 27)=11.967, p<0.001$) suggests differences in general skill learning between the ASD and TD group, with more speed-up for the ASD group. The TRIPLET*BLOCK*GROUP interaction was not significant ($F(1, 27)=1.545, p=0.223$).

DID THE ASD GROUP LEARN THE SEQUENCE IN THE EXPLICIT BLOCKS?

Both ASD and TD groups managed to acquire sequence-specific learning in explicit blocks (Figure 2B) as well (main effect of TRIPLET: $F(1, 27)=11.41; p=0.002$). However, the as ANOVA revealed no difference in sequence-specific learning between ASD and TD groups in the explicit ASRT blocks of the first session (TRIPLET*GROUP interaction: $F(1, 27)=0.035, p=0.854$). The main effect of BLOCK was significant ($F(1, 27)=12.294, p=0.02$), indicating that participants showed general speed-up during the task, irrespectively of triplet types. Additionally, neither the BLOCK*GROUP ($F(1, 27)=1.958; p=0.173$), nor the TRIPLET*BLOCK*GROUP ($F(1, 27)=2.095; p=0.160$) interaction was significant.

DID THE ASD AND THE TD GROUP FORGET THE SEQUENCE DURING THE 16-HOUR OFFLINE PERIOD?

Probe blocks

Analysis of consolidation effects between Session 1 and Session 2 revealed that participants did not show forgetting of the sequence, indicated by the significant difference in the main effect of TRIPLET ($F(1, 27)=10.908, p=0.003$), and the lack of significant differences between the two sessions (TRIPLET*BLOCK interaction: $F(1, 27)=1.333, p=0.259$). The main effect of BLOCK was not significant ($F(1, 27)=0.668, p=0.421$), which suggests that there was no offline general speed-up, irrespectively of triplet types and group BLOCK*GROUP interaction: $F(1, 27)<0.001, p=0.988$). This was also true for sequence-specific learning, as there was no significant difference between the

two groups in this manner (TRIPLET*BLOCK*GROUP $F(1, 27)=2.349$, $p=0.137$), indicating that participants did not show forgetting between Session 1 and Session 2 (**Figure 3A**).

Explicit blocks

Similarly to the implicit probe blocks, participants showed significant sequence-specific learning throughout the offline period in the explicit blocks, indicated by the significant main effect of TRIPLET ($F(1, 27)=15.057$, $p<0.001$), irrespective of the group (TRIPLET*GROUP interaction $F(1, 27)=0.119$, $p=0.733$). Sequence-specific knowledge was retained over the offline period (TRIPLET*BLOCK: $F(1, 27)=2.745$, $p=0.110$). The main effect of BLOCK was not significant ($F(1, 27)=1.831$, $p=0.421$), which suggests that there was no offline general speed-up, regardless of group (BLOCK*GROUP interaction: $F(1, 27)=0.068$, $p=0.796$). The TRIPLET*BLOCK*GROUP interaction ($F(1, 27)=0.421$, $p=0.522$) was not significant, indicating that neither ASD nor TD participants showed forgetting between Session 1 and Session 2 (**Figure 3B**).

DID THE ASD GROUP SHOW AN EFFECT OF FATIGUE?

The so called ‘Within-block position effect’ refers to the effect of fatigue on performance within one block^{11, 23}, and it is usually shown as slower RTs by the end of the block compared to the beginning of the same block²⁴. Interestingly, we found significant group differences in within-block position effects, irrespective of sequence-specific learning: TD children showed a fatigue effect in that they responded slower in the second halves of the blocks compared to the first halves, while ASD children showed similar RTs in the first and second halves indicated by the GROUP*HALFBLOCK interaction in the implicit probe blocks ($F(1, 27)=5.312$, $p=0.029$). The GROUP*HALFBLOCK interaction in the explicit blocks however was not significant ($F(1, 27)=0.030$, $p=0.864$), see in **Figure 4**.

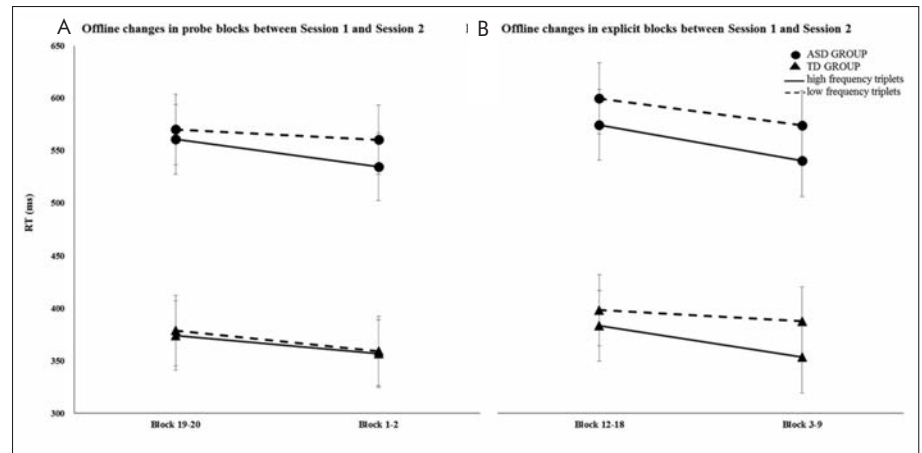


Figure 3. Offline changes in sequence-specific learning in ASD and TD groups in probe (A) and explicit (B) blocks. The gap between the solid (high frequency triplets) and the dashed lines (low frequency triplets) indicates sequence-specific learning. None of the two groups showed a significant difference in performance of probe and explicit blocks between Session 1 and Session 2, indicating that the participants managed to retain the sequence-specific knowledge they gained in Session 1. Error bars indicate SEM

DID THE GROUPS DIFFER IN OVERALL REACTION TIME?

Both in the implicit probe and explicit blocks the ASD group was generally slower compared to the TD group indicated by the main effect of GROUP (in the probe blocks: $F(1, 27)=21.570$, $p<0.001$; in the explicit blocks: $F(1, 27)=19.618$, $p<0.001$). To test whether this general RT difference affected the results of sequence-specific learning, we also conducted all our analyses with normalized data, and found the same pattern of results as reported above.

Discussion

Our aim was to gain better understanding of how performance of children with ASD varies within a task setting consisting of both implicit and explicit conditions. We used an experimental setup involving alternating uncued (implicit) and cued (explicit) probabilistic sequence learning task segments. According to our results, ASD and TD children did not differ in their performance on the explicit blocks, however when instructions were implicit, ASD children outperformed TD children. Following the 16-hour delay period both groups showed intact retention of the previously acquired knowledge. Also, we found an effect of fatigue in the second halves of blocks, but interestingly only for the TD group.

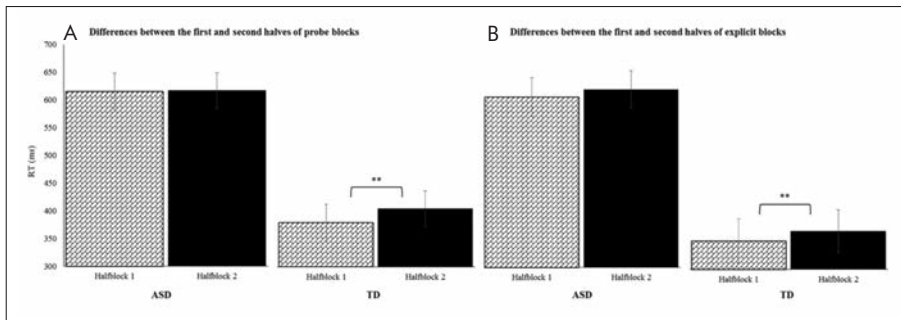


Figure 4. Differences in performance between the first and second halves of blocks. **A** indicates the within block effect on probe blocks, **B** indicates the within block effect on explicit blocks. A significant difference in performance between the first and second parts of the blocks was found in the TD group, however, this was not true for the ASD group

The superior performance of ASD children compared to TD children on probe blocks is in line with previous literature showing intact or even better performance of ASD children on various forms of implicit SRT tasks^{9, 10, 12}. Also, others found intact, however prolonged learning⁸ which is considered to be reflecting cognitive inflexibility.

Interestingly, the pattern of results in explicit blocks showed a distinct picture. In explicit blocks both ASD and TD groups performed similarly, however ASD group outperformed TD groups in implicit probe blocks. This is in line with the results of Travers and colleagues^{14, 15}, who found similar performance between ASD and TD children on an explicit SRT task, but came to the conclusion that despite showing similarities in overall performance, the learning strategy differs for the two groups, which in their case was further confirmed by differences in fMRI activation patterns as well. Regarding the retention of the acquired knowledge, we can conclude that the 16-hour delay period did not abolish the sequence learning gain from the first session, regardless of task conditions. Our results are in line with previous experiments measuring procedural learning of ASD children in a similar setup, also showing significant retention of the acquired knowledge even after a period of delay¹⁰.

According to our results, the transitional effects between probe and explicit blocks differ between the two groups suggesting that the ASD group is less sensitive to these shifts. One possible explanation is that the already developed learning strategy in ASD children does not change even when the implicitness/explicitness of the task changes. This unfolds the question why the transition between explicit and implicit blocks do not have an effect on the performance of ASD children. In other words,

ASD children can transfer the acquired probabilistic sequence knowledge from explicit blocks to the following implicit probe blocks and vica versa. This implies that ASD children do not switch the learning strategy, even if instructions or the structure of the task would require to do so. Such tendencies are in line with the decrease of cortical connectivity¹⁶, the increase in subcortical connectivity^{2, 4} and the deficits in flexible updating mediated by the orbito-frontal cortex²⁵, all together leading to a more rigid learning strategy¹³. Generally, rigidity in task switching situations can be a disadvantage, however according to our current results in probabilistic learning, it can also serve as an advantage.

Differences in the learning strategies of ASD and TD children can be further explained by structural and functional differences in their central nervous system. As already mentioned, some studies found decreased cerebellar and cortical connectivity for ASD children during a motor learning task¹⁶, while again others have shown that subcortical areas are not only intact but in some cases are increased in size and connectivity for ASD children^{2, 4} and show functional differences as well¹⁷. Roser and colleagues²⁶ found that visual exposure to stimuli results in enhanced visual learning of statistical regularities for adults with ASD compared to healthy controls in a visual learning experiment. Superior performance of the ASD group in this task indicates that there is a pronounced visuospatial enhancement in ASD in the visual statistical learning domain. Additionally, procedural learning cued with contextual information is also intact or even improved in children with ASD compared to TD controls²⁷. Statistical learning of language regularities²⁸ points to a similar direction, as high functioning ASD children and matched TD controls demonstrated similarly intact implicit learning of statistical regularities within an artificial language learning paradigm. Motor learning also shows a similar pattern, as ASD children and TD children show similar performance in a motor procedural learning task²⁹, however from certain indexes of the task one can see that the strategy ASD and TD children use for such a task do differ. Overall, procedural learning seems to be intact for the high functioning ASD

population, however the way learning occurs differs between TD children and adults^{27, 29}. This difference might come from the orderliness of brain areas involved in learning for the high functioning ASD population³⁰ and their lower structural and functional cortical connectivity³.

Finally, we found a ‘Within-block position effect’^{11, 23} for the TD children: they slowed down in the second halves of the blocks compared to the first halves, while the ASD children did not show this pattern. This phenomenon might be due to a general fatigue effect, thus it is not learning-dependent. ASD children might be able to focus their attention more selectively on such types of tasks, excluding all other stimuli from their environment, and retain this highly focused attention throughout the task with relatively less effort compared to the TD children. On the other hand, it is also possible that children with ASD have a heightened skill for attenuating the instructions, thus they have the ability to only focus on the main patterns, rules and correlations of a task. Finding such an

effect for TD children is in line with previous experiments finding within-block position effects in the second halves of the blocks in healthy populations^{11, 31, 32}.

To sum up, the present study found not only intact, but even superior implicit learning performance in children with ASD compared to TD children. Also, the two groups did not differ in their performance during explicit blocks, nor in overall consolidation effects. Furthermore, our results showed a resistance against fatigue effect in ASD. Our findings can help in planning more targeted therapeutic setups for ASD children or other populations showing a similar pattern of difficulties in learning.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Research and Technology Innovation Fund, Hungarian Brain Research Program (KTIA NAP 13-2-2014-0020), and Janos Bolyai Research Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences (to K. J.).

REFERENCES

- Rosenthal M, Wallace GL, Lawson R, Wills MC, Dixon E, Yerys BE, et al. Impairments in real-world executive function increase from childhood to adolescence in autism spectrum disorders. *Neuropsychology* 2013;27(1):13. <https://doi.org/10.1037/a0031299>
- Hollander E, Anagnostou E, Chaplin W, Esposito K, Haznedar MM, Licalzi E, et al. Striatal volume on magnetic resonance imaging and repetitive behaviors in autism. *Biological psychiatry* 2005;58(3):226-32. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.03.040>
- Just MA, Cherkassky VL, Keller TA, Kana RK, Minshew NJ. Functional and anatomical cortical underconnectivity in autism: evidence from an FMRI study of an executive function task and corpus callosum morphometry. *Cerebral cortex* 2007;17(4):951-61. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhl006>
- Muller RA, Pierce K, Ambrose JB, Allen G, Courchesne E. Atypical patterns of cerebral motor activation in autism: a functional magnetic resonance imaging study. *Biological Psychology* 2004;49:665-76. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01004-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01004-0)
- Solomon M, Ozonoff S, Ursu S, Ravizza S, Cummings N. The neural substrates of cognitive control deficits in autism spectrum disorders. *Neuropsychologia* 2009;47:2515-26. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.04.019>
- Squire LR. Mechanisms of memory. *Science* 1986;232(4758):1612-9. <https://doi.org/10.1126/science.3086978>
- Song S, Howard JH, Howard DV. Implicit probabilistic sequence learning is independent of explicit awareness. *Learning & Memory* 2007a;14(3):167-76. <https://doi.org/10.1101/lm.437407>
- Barnes KA, Howard Jr, JH, Howard DV, Gilotty L, Kenworthy L, Gaillard WD, Vaidya CJ. Intact implicit learning of spatial context and temporal sequences in childhood autism spectrum disorder. *Neuropsychology* 2008;22(5):563. <https://doi.org/10.1037/0894-4105.22.5.563>
- Foti F, De Crescenzo F, Vivanti G, Menghini D, Vicari S. Implicit learning in individuals with autism spectrum disorders: a meta-analysis. *Psychological medicine* 2015;45(05):897-910. <https://doi.org/10.1017/S0033291714001950>
- Nemeth D, Janacsek K, Balogh V, Londe Z, Mingesz R, Fazekas, Vetro A. Learning in autism: implicitly superb. *PloS One* 2010;5(7):e11731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011731>
- Nemeth D, Janacsek K, Fisher J. Age-dependent and coordinated shift in performance between implicit and explicit skill learning. *Frontiers in computational neuroscience* 2013;7:147. <https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00147>
- Brown J, Acze, B, Jiménez L, Kaufman SB, Grant KP. Intact implicit learning in autism spectrum conditions. *The quarterly journal of experimental psychology* 2010;63(9):1789-812. <https://doi.org/10.1080/17470210903536910>
- Gordon B, Stark S. Procedural learning of a visual sequence in individuals with autism. *Focus on autism and other developmental disabilities* 2007;22(1):14-22. <https://doi.org/10.1177/10883576070220010201>
- Travers BG, Klinger MR, Mussey JL, Klinger LG. Motor linked implicit learning in persons with autism spectrum disorders. *Autism Research* 2010;3(2):68-77. <https://doi.org/10.1002/aur.123>
- Travers BG, Kana RK, Klinger LG, Klein CL, Klinger MR.

- Motor learning in individuals with autism spectrum disorder: activation in superior parietal lobule related to learning and repetitive behaviors. *Autism Research* 2015;8(1):38-51.
https://doi.org/10.1002/aur.1403
16. Mostofsky SH, Powell SK, Simmonds DJ, Goldberg MC, Caffo B, Pekar JJ. Decreased connectivity and cerebellar activity in autism during motor task performance. *Brain* 2009;awp:088.
https://doi.org/10.1093/brain/awp088
 17. Brambilla P, Hardan A, di Nemi SU, Perez J, Soares JC, Barale F. Brain anatomy and development in autism: review of structural MRI studies. *Brain research bulletin* 2003;61(6):557-69.
https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2003.06.001
 18. Howard JH. Jr, Howard DV. Age differences in implicit learning of higher-order dependencies in serial patterns. *Psychol. Aging* 1997;12:634-56.
https://doi.org/10.1037/0882-7974.12.4.634
 19. Remillard G. Implicit learning of second-, third-, and fourth-order adjacent and nonadjacent sequential dependencies. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology* 2008;61(3):400-24.
https://doi.org/10.1080/17470210701210999
 20. Song S, Howard JH, Song S, Howard JH, Howard DV. Sleep does not benefit probabilistic motor sequence learning. *The Journal of Neuroscience* 2007b;27(46):12475-83.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2062-07.2007
 21. Howard DV, Howard JH Jr, Japikse K, DiYanni C, Thompson A. Implicit sequence learning: effects of level of structure, adult age, and extended practice. *Psychol Aging* 2004;19:79-92.
https://doi.org/10.1037/0882-7974.19.1.79
 22. Soetens E, Melis A, Notebaert W. Sequence learning and sequential effects. *Psychological Research* 2004;69(1-2):124-37.
https://doi.org/10.1007/s00426-003-0163-4
 23. Gamble KR, Cummings Jr, TJ, Lo SE, Ghosh PT, Howard Jr, JH, Howard DV. Implicit sequence learning in people with Parkinson's disease. *Frontiers in human neuroscience* 2014;8.
https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00563
 24. Török B, Janacsek K, Nagy DG, Orbán G, Nemeth D. Measuring and filtering reactive inhibition is essential for assessing serial decision-making and learning. In press.
 25. Solomon M, Smith AC, Frank MJ, Ly S, Carter CS. Probabilistic reinforcement learning in adults with autism spectrum disorders. *Autism Research* 2011;4(2):109-20.
https://doi.org/10.1002/aur.177
 26. Roser ME, Aslin RN, McKenzie R, Zahra D, Fiser J. Enhanced visual statistical learning in adults with autism. *Neuropsychology* 2015;29(2):163.
https://doi.org/10.1037/neu0000137
 27. Kourkoulou A, Leekam SR, Findlay JM. Implicit learning of local context in autism spectrum disorder. *Journal of autism and developmental disorders* 2012;42(2):244-56.
https://doi.org/10.1007/s10803-011-1237-6
 28. Mayo J, Eigsti IM. Brief report: A comparison of statistical learning in school-aged children with high functioning autism and typically developing peers. *Journal of autism and developmental disorders* 2012;42(11):2476-85.
https://doi.org/10.1007/s10803-012-1493-0
 29. Sparaci L, Formica D, Lasorsa FR, Mazzone L, Valeri G, Vicari S. Untrivial Pursuit: Measuring Motor Procedures Learning in Children with Autism. *Autism Research* 2015;8(4):398-411.
https://doi.org/10.1002/aur.1455
 30. Schipul SE, Williams DL, Keller TA, Minshew NJ, Just MA. Distinctive neural processes during learning in autism. *Cerebral Cortex* 2011;bhr162.
 31. Rickard TC, Cai DJ, Rieth CA, Jones J, Ard MC. Sleep does not enhance motor sequence learning. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition* 2008;34(4):834.
https://doi.org/10.1037/0278-7393.34.4.834
 32. Brawn TP, Fenn KM, Nusbaum HC, Margoliash D. Consolidating the effects of waking and sleep on motor-sequence learning. *The Journal of Neuroscience* 2010;30(42):13977-82.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3295-10.2010

EPILEPSZIA LIGA HÍREK

Pályázati hirdetés a Magyar Epilepszia Liga (MEL)

EPILEPSZIÁBAN JÁRTAS ORVOS/EPILEPSZIASPECIALISTA minősítés odaítélésére/meghosszabbítására

Kedves Kollégák!

A MEL *EPILEPSZIASPECIALISTA (ESP)* és *EPILEPSZIÁBAN JÁRTAS ORVOS (EJO)* tanúsítványai lejártak.

A társasági minősítések megújítása pályázat útján történik. A pályázathoz szükséges adatlapot és mellékleteit megtalálhatják a www.epilepszia.hu honlapon. Tagjainknak, valamint a rajna@multiart.hu címen bejelentkező további érdeklődőknek az anyagot a MEL Akkreditációs Bizottsága személyesen is elküldi. A pályázatokat 2017. június 15-ig várjuk.

2017. március

Fogarasi András,
a MEL elnöke

A SPORTOLÁS ÉS A BALESETI AGYSÉRÜLÉS ÖSSZEFÜGGÉSEI – VESZÉLYEK ÉS KÖVETKEZMÉNYEK

TAMÁS Viktória¹, KOVÁCS Noémi¹, BÜKI András^{1, 2, 3}

¹Pécsi Tudományegyetem, KK, Idegsebészeti Klinika, Pécs

²Pécsi Tudományegyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont, Pécs

³MTA-PTE, Klinikai Idegtudományi Képzőközpont, Pécs



Hungarian

<http://dx.doi.org/10.18071/isz.70.0089>

www.elitmed.hu

RELATIONSHIP BETWEEN SPORT AND TRAUMATIC BRAIN INJURY – RISKS AND SEQUELAE

Tamás V; Kovács N, MD; Büki A, MD, PhD, DSc

Ideggyogy Sz 2017;70(3–4):89–96.

A baleseti agysérülés (TBI) jelentős köz-, népegészségügyi problémát jelent szerte a világon. A koponyatraumák egyik jellegzetes formája a sportolás kapcsán elszenvedett agysérülés, mely súlyosság tekintetében az enyhétől egészen a fatális sérülésekig terjedhet. A sportokkal összefüggő minor fejtraumák jelentőségét a magas incidencia, a fiatal korosztály nagymértékű bevonódása, illetve azok potenciálisan ismétlődő (repetitív) jellege adja. Az ismételt enyhe koponyatraumák kumulálódva ugyanis komplex strukturális, neurokémiai, neuroendokrin és pszichológiai változásokhoz vezethetnek, melyek hosszú távon fennmaradva a traumát elszenvedett egyén életminőségének, a mindennapi tevékenységekben való részvételének jelentős romlását eredményezhetik.

Jelenleg sem a sérülés negatív következményeiről, sem a prevenció módjáról, illetve a káros hosszú távú következmények kivédéséről sem rendelkezünk kellő ismerettel. Ezzel az összefoglaló tanulmánnyal kívánjuk felhívni a figyelmet a sportsérülésekkel kapcsolatban felmerülő lehetséges veszélyekre, továbbá hangsúlyozzuk az e területen induló klinikai vizsgálatokban való részvétel, valamint a közlemények követésének fontosságát.

Kulcsszavak: enyhe baleseti agysérülés, sportok, repetitív minor fejtrauma, krónikus traumatikus encephalopathia, concussion

Traumatic brain injury represents major public health problem worldwide. A typical form of brain injuries is the injury suffered during sports, which according to severity ranges from mild injuries to fatal damages. The significance of the sport related minor head injuries derives from the high incidence, the excessive involvement of the younger age groups, and their potential repetitive nature. The repeated mild head injuries may accumulate, leading to complex structural, neurochemical, neuroendocrine, and psychological alterations, which in long term may result in changes of the patients quality of life and in significant deterioration of participation in the everyday activity.

Actually we neither have enough knowledge about the negative consequences, nor the way of prevention, or protection against the harmful long term results.

With this study summary we would like to draw attention to the potential hazards emerging from sport injuries, moreover we would like to emphasize the importance of study participation and follow up of articles in this field.

Keywords: mild traumatic brain injury, sports, repetitive minor head trauma, chronic traumatic encephalopathy, concussion

Levelező szerző (correspondent): TAMÁS Viktória, Pécsi Tudományegyetem, KK, Idegsebészeti Klinika;
7623 Pécs, Rét utca 2. E-mail: tamas.viktoria@pte.hu
<http://orcid.org/0000-0002-2388-7287>

Érkezett: 2016. október 14.

Elfogadva: 2016. december 13.

Baleseti agysérülés – általános vonatkozások

A baleseti agysérülés (TBI) jelentős köz-, népegészségügyi problémát jelent világszerte. Az Egyesült Államokban évente körülbelül 1,7–3,8

millió amerikai állampolgár kerül kórházba baleseti agysérüléssel, ami meghaladja mind a stroke, mind az epilepszia incidenciáját^{1–6}.

Az epidemiológiai vizsgálatok szerint a baleseti koponya-, agysérülések rendkívül gyakoriak a fiatal életkori periódusban és a férfiakat kétszer gyakrab-

ban érintik, mint a nőket³. A koponyasérültek között azonban megfigyelhető az idősebb korcsoportba tartozó egyének nagyobb aránya is, akiknél a magas (65 év feletti) életkor rizikótényező lehet a mortalitás tekintetében, hiszen a körükben meglévő alapbetegségek negatívan befolyásolhatják a sérülés kimenetelét^{3, 7}.

A traumás agysérülések az esetek nagy részében közlekedési balesetektől (motor-, gépjárműútkezesek, gázolások), fizikai erőszakból, esésekből, magasból történő zuhanásokból, lött-szúrt sérülésekből, illetve sport- és rekreációs tevékenységekből származhatnak^{2, 3, 7, 8}. A robbanások okozta és az erőszakos, fegyveres támadások az országok nagy részében az aktív életkorban, leginkább szolgálatban lévő katonai személyzetnél vezetnek koponya-traumához a hadszíntereken^{3, 9}.

Az idősebb populáció esetében a fejsérülések vezető okai közé elsősorban az esések tartoznak, míg a fiatal korosztály körében a nem szabályszerű gépjárműhasználat és a különböző sporttevékenységekben való részvétel eredményezhet ilyen típusú sérüléseket. A baleseti agysérülés előfordulásában sokszor szerepet játszanak bizonyos egyéb kockázati faktorok, mint a drog- és alkoholhasználat, a közlekedési szabályok áthágása, továbbá a megfelelő védőruházatok/felszerelések használatának elmaradása, melyek hozzájárulhatnak a polytrauma kialakulásához, valamint a mortalitás, morbiditás magas arányához⁷.

Enyhe baleseti agysérülés

A traumás koponya-, agysérülések egy kontinuum mentén mozoghatnak a súlyosság tekintetében, azaz az enyhe agyrázkódástól a fatális sérülésekig terjedhetnek¹. A koponyatraumák 80–90%-a enyhe fejsérülés, 10–20%-ot a középsúlyos/mérsékelt és súlyos esetek tesznek ki. A National Head Injury Association adatai szerint a fejsérülések mintegy 18%-a valamilyen sport- és rekreációs tevékenységből adódik, melyek elszenvedői túlnyomórészt férfiak (az összes sport-, és rekreációs tevékenységből koponyasérülést szerzett egyének 71%-a)¹⁰.

Legtöbb esetben ezek a sportokból, rekreációs tevékenységekből származó koponyatraumák az enyhe kategóriába sorolhatók és a szakemberek általában „concussiónak”, agyrázkódásnak véleményezik őket^{2, 5, 8}. Az Egyesült Államokban megközelítőleg 300 000 ilyen concussió sérülés fordul elő évente.

Az enyhe baleseti agysérülés/concussio lényegében egy olyan zárt fejsérülés, mely a fejre mért hirtelen biomechanikai erőbehatásokból adódik, s az

agy koponyaalapnak történő nekiütődését eredményezve az agyszövet vagy az érrendszer deformitását okozza, illetve funkcionális károsodásokhoz vezet^{9, 11}.

A baleseti agysérülések egyik fő jellemzője, hogy hosszú távon jelentős következményeket vonhatnak maguk után. A különböző súlyosságú fejsérülést elszenvedett egyének rövid és hosszú távú kimenetelében, valamint a fennmaradó kognitív, fizikai, emocionális és szociális működési mintázataiban számos különbség, de ugyanakkor számos hasonlóság is rejlik. Az enyhe baleseti agysérült betegek általában hamarabb, könnyebben felépülnek, és többnyire visszaszerzik a sérülésük előtti funkcionálisukat, azonban a közép-súlyos vagy súlyos agysérülést szenvedett betegeknél maradandó károsodások léphetnek fel, melyek negatívan befolyásolják mindennapi működési mintázataikat¹.

Lényeges azonban, hogy olykor még egy enyhe fejsérülés, egy kisebb concussio is okozhat komolyabb, hosszú távú deficiteket, melyek korlátozzák az egyént a hétköznapi teendők elvégzésében^{3, 8, 12}.

Minor fejtraumák előfordulása a sportokban

A sportokkal kapcsolatos concussiók egyre növekvő incidenciája – mely főként az aktív, fiatal (20–30 éves) populációt érinti¹³ –, továbbá a lehetséges hosszú távú problémák fokozzák az aggodalmat a közegészségügyben, az érdekvédelmi szervezetekben, valamint a civil lakosság köreiben is¹⁴. Mivel a sportolók/játékosok gyakran nincsenek tudatában a tüneteknek vagy túlzottan alulértékelik a concussiókat és az azzal járó veszélyeket – valamilyen külső vagy belső nyomásra –, a nem jelentett concussiók epizódok aránya még mindig magas¹⁰.

Ezenfelül, kizárólag a concussiókkal kapcsolatban kimutatták, hogy több, egymással összehasonlítható sport (például labdarúgás, jéghegyi, kosárlabda) esetében megfordul a nemi arány, azaz a nőknél magasabb az incidencia, mint a férfiaknál, illetve, hogy a fiatalabb egyének/atléták agya jóval érzékenyebb az ilyesfajta sérülésekre a még éretlen neuroanatómiai viszonyok miatt és felépülésükhöz – különösen a memória-funkciójuk javulásához – több időre van szükség^{4, 15}.

Enyhe fejsérülések, concussiók elszenvedése – a sportokkal összefüggésben – elsősorban a kontakt- és küzdősportokban fordul elő nagy gyakorisággal, úgy mint az amerikai futballban, a bokszbán, a rögbiben, a jéghegyiben, a birkózásban, a karatében,

vagy a lacrosse-ban, ahol ezek a sérülések jelentős kihívást jelentenek a szakemberek számára a diagnosztikát és az orvosi ellátást illetően¹⁶.

Sportolás során minor koponyasérülést elszenvedett betegek gyakran számos postconcussio tünetéről (szimptomás concussio) – fejfájásról, fáradtságról, szédülésről, irritabilitásról, csökkent koncentrációról, alvászavarról, depresszióról, szorongásról, agresszióról, nyugtalanságról, illetve különféle kognitív következményekről – számolhatnak be, melyek tartósan fennmaradhatnak a sérülést követően^{8, 16}. Ugyanakkor kisebb mértékű, subconcussiv behatások is érhetik a sportolók fejét, melyek azonban sok esetben nem produkálnak látható, akut tüneteket (aszimptomás subconcussio)⁹.

A sportokkal kapcsolatos enyhe koponya-, agytraumák jelentősége tehát nem elhanyagolandó a fellépő, lehetséges negatív következmények értelmében – éppen a fentiek miatt – éreztük időszűrűnek és érdemesnek áttekintést adni e területről.

REPETITÍV ENYHE BALESETI AGYSÉRÜLÉSEK KUMULATÍV HATÁSAI A KONTAKT- ÉS KÜZDŐSPORTOKBAN

Ismert tény, hogy a fiatalok jelentős része – középiskolás, főiskolai és hivatásos atléták – űz valamilyen populáris kontaktsportot, melyek az agyi traumák elszenvedésének és azok megismétlődésének magas kockázatával járhatnak. A legtöbb akut fejsérülés pihenéssel javulhat ugyan, de megfelelő nyugalmi periódus nélkül megnő a kockázat a kumulatív sérülés kialakulására¹¹. Továbbá, kutatók alátámasztották, hogy azoknál az atlétáknál, akiknek volt már concussio előtörténete, megnő a kockázat egy következő concussio trauma elszenvedésére^{2, 10, 11}, s ezáltal a sérülések összeadódására. *Guskiewicz* és munkatársai például amerikai futbalistáknál kimutatták, hogy azok a játékosok, akiknek három vagy több concussioja volt korábban, háromszor nagyobb valószínűséggel szereztek újabb hasonló sérülést, mikor összevetették őket olyan sportolókkal, akiknek nem volt concussio előtörténete¹³.

A fejet érő, repetitív biomechanikai traumák az egyes sporttevékenységek alkalmával komplex strukturális, neurokémiai, neurometabolikus és pszichológiai (kognitív, emocionális és viselkedéses) változásokkal járhatnak a gyorsulási-lassulási erőhatásoknak köszönhetően, melyek hosszú távon a neuronális sejtmembrán és az axonális kapcsolatok további szétbomlásához, végül pedig progresszív intellektuális hanyatláshoz vezethetnek^{8, 17}.

Az ismételten szerzett koponyatraumák kumulatív, negatív hatásait számos vizsgálat bizonyította a durvább, ütközéses sportok esetében (például ame-

rikai futball, boks, jégheki)^{8, 9, 18}, ugyanis ezeknél a sportoknál a fej nagyobb mértékben sérül egy-egy edzés vagy mérkőzés alkalmával, illetve a szimptomás concussiókon kívül akár több subconcussiv behatás is érheti a fejet egy idény vagy szezon alatt. Amerikai futball során, a pályán bizonyos pozícióban lévő atléták akár 1400 ilyen subconcussiv behatást szenvedhetnek el, míg a középiskolás játékosok – akik kevésbé tapasztaltak – körülbelül 2000 ilyen sérülést szerezhetnek a támadó-védekező pozíciókban⁹.

Gajawelli és munkatársai egy vizsgálatukban diffúziós tenzor képalkotással vetették össze – kontakt- és nem kontaktsportolók esetében – az ismételt fizikai behatás okozta agyi eltéréseket szezon előtt és után. Az eredmények szignifikáns különbséget jeleztek az inferior frontooccipitalis fasciculusban, a superior és posterior corona radiatában, a corpus callosum spleniumában, illetve a capsula externában mért frakcionális anizotrópia értékekben a kontakt- és nem kontaktsportot űző sportolók között⁸. A kontaktsportokban tehát a fejet érő gyakori ütések az agyi fehérállományi struktúrák krónikus elváltozásához vezethetnek.

Természetesen, nemcsak a küzdő- és kontaktsportok, hanem egyéb más sportok is összefüggésbe hozhatók az ismételt baleseti agysérüléssel, így például a lovaglás, a síelés vagy az ejtőernyőzés^{9, 18}.

NEUROKOGNITÍV KIMENETEL

Sporttól függetlenül a minor fejtraumák és a kognitív hanyatlás közötti korrelációt már több kutatás során kimutatták felnőtt és kamaszkorú egyének csoportjában⁸.

Vanderploeg és kollégái egy vizsgálatukban például azt tapasztalták – gépjárműbalesetet szenvedett férfi veteránoknál –, hogy még az enyhe baleseti agysérülésnek is lehetnek ártalmas, hosszú távú neuropszichológiai következményei, melyek a komplex figyelmi és munkamemória-funkciókat érintik¹². Számos vizsgálat létezik azonban, melyekben a kutatók postconcussiv anatómiai, illetve neurokognitív változásokat mutattak ki olyan kontaktsportok esetében, mint a boks, a hoki vagy az amerikai futball^{8, 9}.

Collins és kollégái egy korábbi munkájuk során a concussio kórtörténet (egy vagy több concussiv sérülés) és a tanulási nehézség közötti korrelációt, valamint e tényezőknek a neuropszichológiai teljesítménnyel való kapcsolatát mérték fel főiskolás amerikaifutball-játékosoknál, illetve értékelték a postconcussio felépülést is. A vizsgálatban kimutatták, hogy a concussio kórtörténet és tanulási nehézség egymástól függetlenül szegényesebb kog-

nitív teljesítményt eredményez a sportolóknál. A tanulási nehézséggel küzdő sportolóknál az egzekutív működésben (például a tervezésre való képességben), az információfeldolgozási sebességben, a szófluenciában és a memóriaműködésben figyeltek meg gyengébb teljesítményt. A többszörös concussiókat elszenvedett játékosok pedig hosszú távú zavarokat mutattak a végrehajtó funkciók és az információfeldolgozási sebesség terén, illetve több postconcussiv tünetről számoltak be¹⁹.

Egy másik vizsgálatban *Talavage* és kollégái a neurológiai teljesítményt és az egészségi állapotot mérték fel amerikai futballt játszó fiatal középiskolás, férfi egyénenél a fejet érő ütközéses eseményekkel összefüggésben a neurokognitív tesztelés (ImPACT), funkcionális mágneses képalkotás és az ütközéses események longitudinális méréseit alkalmazva. Eredményeik szerint azoknál a játékosoknál is megjelentek detektálható neurokognitív deficit (elsősorban a vizuális munkamemória zavara) és neurofiziológiai változások (módosult aktiváció a dorsolaterális prefrontális kéregben), akiknek nem voltak klinikailag megfigyelhető tüneteik. Ebből arra következtettek a kutatók, hogy jóval több játékos szenved neurológiai és kognitív diszfunkcióktól, mint ami a hagyományos, concussiót felmérő eszközökkel feltérképezhető. Mivel ezek az egyének – a fennálló neurofiziológiai és kognitív deficitekkel – klinikai kivizsgálás és kiértékelés nélkül folytatják a részvételt a kontaktsportban, megnövekszik a kockázat egy jövőbeni, hosszú távú neurológiai és neurokognitív károsodás elszenvedésére¹¹.

Guskiewicz és munkatársainak egy – a repetitív fejtraumák és Alzheimer-kór kapcsolatát vizsgáló – munkája szerint azoknál az sportolóknál, akik korábban többszörös/ismételt concussiókat szenvedtek el, ötszöröse emelkedett az enyhe kognitív sérülés előfordulása, valamint az Alzheimer-kór korai megjelenése, összevetve az életkor szerint illesztett kontrollcsoporttal^{20, 21}.

Krónikus baleseti encephalopathia – CTE

A kontakt- és küzdősportokkal összefüggésben, hosszú távon megfigyelhető – sorozatos laesiók/microlaesiók okozta – globális, irreverzibilis működészavart az agyban krónikus baleseti encephalopathiának (CTE) definiálja jelenleg a szakirodalom. Lényegében egy neurodegeneratív betegségről van szó, mely a kognitív (orientációs, memória-, figyelem, egzekutív, nyelvi) funkciók hanyatlásához vezető, gyakran depresszióval, suicidiummal, szegényes impulzuskontrollal, agresszivitással, illetve a Parkinson-kórra jellemző mozgásszervi tünetek-

kel (parkinsonizmussal) járó állapot, és végső soron súlyos dementiával zárulhat^{9, 16, 22, 23}.

Mágneses rezonanciás képalkotással hippocampus és vermis atrófia, diffúz axonális sérülés, hypophysis- és mediotemporalis lebenyatrófia, kitágult perivascularis ürök és periventricularis fehérállományi rendellenességek mutathatók ki krónikus baleseti encephalopathiában szenvedő, kontaktsportot űző sportolóknál^{9, 21}.

A krónikus traumatikus encephalopathia (CTE) csak évekkel a concussiók sérülések vagy a sorozatos erőbehatások elszenvedését követően tűnik fel és olykor nem kizárt, hogy a motoros neuronok deficitje kíséri, ami krónikus traumatikus encephalomyelopathiáként (CTEM) van számon tartva a szaknyelvben, s klinikailag hasonló képet ad az amyotrophiás lateralsclerosishoz^{9, 24}.

Neuropatológiai kutatások eredményei azt mutatták, hogy a krónikus baleseti encephalopathia jóval gyakoribb a kontaktsportot folytató sportolóknál, mint azt eleinte gondolták, s már a betegség korai fázisában felléphet koncentrálási, szótalálási nehézség, emocionális instabilitás, depresszió, illetve suicid késztetés¹⁸.

Tulajdonképpen az amerikai futballt játszó sportolók körében megfigyelt agyi leépülés és öngyilkossági hajlam hozta köztudatba ezt a betegséget, azonban korábban már a hivatásos boksolók esetében is azonosították az azonos patológiával bíró dementia pugilisticát vagy másnéven „punch-drunk szindrómát”^{15, 24}. Korábban a szindróma változó megjelenési formái miatt két elnevezést is használtak; az előbbiekben említett „dementia pugilistica” inkább a gondolkodással és viselkedéssel kapcsolatos zavarokkal (például memóriadeficit, paranoia, hallucinációk) járt együtt, míg a „parkinsonism dementia” elnevezést a mozgás- és egyensúlyzavarral járó tünetek (például meglassultság, tremor, járási nehézség, merevség) domináló manifesztálódására alkalmazták elsősorban.

Több kutatás átfedést talált a krónikus baleseti encephalopathia és az Alzheimer-betegség klinikai megjelenése és patogenezise között, sőt megfigyelték, hogy a krónikus baleseti encephalopathia az idősök körében felgyorsíthatja az agyi leépülést²¹.

Neurokémiai, neuropatológiai következmények

A kontakt küzdősportokban előforduló repetitív agyi traumák gyakran okoznak neurokémiai változásokat. A neurokémiai változások kapcsán az agyvízből és/vagy szérumból kimutatható biomarkerekben (T- τ , NF-L, GFAP, TDP-43 és S-100B) figyelhető meg eltérés, még abban az esetben is, ha nincsenek nyilvánvaló jelei a concussiónak vagy a

traumás agyi sérülésnek. A T- τ és az NF-L fehérjék az axonalis sérülés, míg a GFAP és S-100B fehérjék a gliasejtek károsodásnak indikátorai²⁵.

Zetterberg és munkatársai egy vizsgálatukban amatőr bokszolóknál találtak bizonyítékot az agyszövet szubklinikai sérülésére, ezeket a biomarkereket elemezve. A legkifejezettebb az NF-L (neurofilament light protein) fehérje mennyiségének növekedése volt, mely erős korrelációt mutatott a fejre mért ütések számával²⁵.

Hasonló eredményre jutottak *Neselius* és társai, akik a T- τ , NFL, GFAP, és S-100B fehérjék megnövekedett szérumszintjeit figyelték meg olimpiai bokszolóknál mind a fejtraumát követő akut szakaszban, mind pedig a fejsérülést követő későbbi időszakban, melynek hátterében a központi idegrendszer minor sérüléseinek kumulatív hatása feltételezhető¹⁵.

Több vizsgálat során megfigyelték krónikus bal-eseti encephalopathiában szenvedő sportolóknál, hogy különösen magas a T- τ fehérje szintje, melyek úgynevezett neurofibrillaris kötegekbe állnak össze az agyállományban. A suicidumot elkövető kontaktusportolók agyában is ilyen kötegeket találtak. Egyes kutatók feltételezései szerint a hiperfoszforilált τ fehérje abnormális módon felhalmozódik az agyszövet külső részeiben és károsítja, végső soron pedig elpusztítja az agysejteket^{18, 24}. Az ismételt fejsérülések eredményeként megjelenő krónikus bal-eseti encephalopathia esetében tehát egy progresszív taupathiáról van szó, mely a neuronok irreverzibilis pusztulásához vezet. A krónikus baleseti encephalopathia tehát a τ fehérje izoformáit tekintve nem különbözik az Alzheimer-kórtól, de a τ -depozitumok irreguláris volta, és a sulcusok mélyen való perivascularis csoportosulása, valamint a neurofibrillaris kötegek magasabb sűrűsége megkülönbözteti egyéb taupathiákban megfigyelhetőktől²⁴.

Neuroendokrin változások

A repetitív minor koponyatraumák és subconcussiv behatások későbbi következménye lehet az agyalapi mirigy funkciózavara is, melyre egyre nagyobb figyelem összpontosul a szakirodalomban és egyre több vizsgálat próbálja igazolni a minor fejsérülésekkel összefüggő hypophysis-diszfunkciót.

A súlyos és mérsékelt baleseti agysérülésekkel kapcsolatban már kimutatták, hogy a traumát követően leggyakrabban a szomatotrop és gonadotrop hormonok elégtelensége figyelhető meg az endocrinopathiák közül, míg a mellékvesekéreg elégtelenségei, a diabetes insipidus, illetve a hypothyreoidismus ritkábban fordulnak elő^{26, 27}.

A hypopituitarismus súlyossága és megjelenése

jelentősen összefügg a koponya-, agysérülés mértékével. Továbbá, kimutatták, hogy a fejsérülések gyakorisága és súlyosságuk magasabb foka kapcsolatban van a megelőző többszörös enyhe koponyatraumákkal²⁰. Ezen összefüggésekből kiindulva jogos a feltételezés, miszerint a repetitív minor fejtraumák és subconcussiv sérülések kumulatív hatásaként az agyalapi mirigy működészavara alakulhat ki.

Egy, a hypophysis funkcióit elemző vizsgálatban amatőr (aktív) és visszavonult/nyugdíjazott kickbokszolókat hasonlítottak össze, mivel esetükben a fej nagymértékben ki van téve a sérülés veszélyének. A kutatók eredményül azt kapták, hogy az IGF-1 – ami egy növekedésért, izomnövekedésért felelős, inzulinszerű hormon – szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kick-boksztól űzők esetében. A 22 kick-bokszolóból öt főnek volt GH- (növekedési hormon) és két főnek volt ACTH-hiánya. Jelentős negatív korrelációt fedeztek fel továbbá az IGF-1 szintje, a kor, a sportolás időtartama és a „küzdelmek” száma között. Az eredmények szerint tehát a kick-boksztól – melynek során gyakori lehet az enyhe fejsérülések megismétlődése – hypopituitarismust, s különösen izolált GH-elégtelenséget okozhat²⁶.

Ugyan még kevés bizonyíték született a repetitív minor fejtraumák és a hypophysis-diszfunkció közötti korreláció tekintetében, az eddigi eredmények mégis arra utalnak, hogy fontos volna folyamatosan szűrni, ellenőrizni a kontakt-, illetve küzdősportolókat, akik gyakran szenvednek az ismétlődő agyi traumák okozta működészavarok krónikus hatásaitól.

Labdarúgás: szükséges-e az aggodalom?

Egyre magasabb a minor koponyatraumák/concussiók előfordulási gyakorisága a labdarúgók körében is, kiváltképp a fiatal korosztályban⁵. Ez egyrészt annak köszönhető, hogy a labdarúgás régóta az egyik legelterjedtebb – napjainkban is egyre nagyobb népszerűségnek örvendő – sportág a világon^{2, 28}, másrészt összefügghet a fiatalok magasabb impulzivitásával, illetve az enyhe fejsérülések jelentőségének alulbecslésével.

A labdarúgás esetében olyan dinamikus sportról van szó, melyben a játékosok nincsenek kitéve a fejsérülések magas kockázatának, azonban az eddigi vizsgálatok szerint a concussiók aránya meglehetősen magas körökben, akár a többi kontaktusportban előforduló concussiók rátákat is meghaladva². A védtelen fej a játék egyik elsődleges eszköze a

sorozatos fejelések miatt, illetve gyakran ütközhet a talajjal, a kapufával, a labdával vagy egy másik játékoskal az edzések, mérkőzések során^{2, 28}. Ennek kapcsán felmerül a kérdés, hogy az ismétlődő concussiók, illetve a fejelések mint subconcussiv behatások okoznak-e visszafordíthatatlan, krónikus agyi elváltozásokat és kognitív deficiteket a labdarúgók-nál^{16, 22, 23, 25}. Ez a felvetés azonban máig vitatott és tisztázatlan, illetve sok ellentmondó eredmény született a témával kapcsolatban.

KOGNITÍV KÖVETKEZMÉNYEK

Számos vizsgálatban próbáltak összefüggést találni a fejelések és a kogníciót érintő rövid és hosszú távú következmények között.

Witol és Webbe egyik ilyen kutatásukban kimutatták, hogy a magasabb fejelési aránnyal rendelkező játékosok rosszabb teljesítményt nyújtanak a memóriát, a figyelmet, a koncentrációt, a mentális rugalmasságot és az egyéb kognitív funkciókat mérő tesztekben, összevetve az alacsonyabb fejelési számmal rendelkező játékosokkal²⁸.

Matser és munkatársai hasonló fordított arányú korrelációt kaptak, mikor amatőr labdarúgók-nál vizsgálták a concussiók ráta és a neuropszichológiai teljesítmény közötti összefüggést, azaz minél magasabb volt a concussiók száma egy játékosnál, annál alacsonyabb pontot ért el a kognitív funkciókat mérő tesztekben²⁹.

Lipton és kutatócsoportja több vizsgálatban igyekeztek kimutatni a fejelések gyakorisága és a lehetséges hosszú távú következmények közötti kapcsolatot. Az egyik ezzel kapcsolatos kutatásukban arra utaltak az eredmények, hogy a gyakori fejelés nem eredményez nyilvánvaló neurokognitív változásokat, ugyanakkor a viszonylag rövid időintervallum alatti fejelések magas száma enyhe mértékű hanyatlást eredményezett a játékosok vizuomotoros tempójában és verbális memóriájában²². Egy másik vizsgálatuk eredményei alapján arra következtettek a kutatók, hogy a fejelés összefügg az agyi fehérállomány abnormális mikrostruktúrájával és a szegényes neurokognitív teljesítménnyel²³.

Tysvaer és Lochen (1991; idézi²) egy neuropszichológiai tesztek-ből álló kiterjedt battériát alkalmaztak nyugdíjba vonult labdarúgók kognitív felértékelésére és a kiértékeléseket követően a vizsgálatba bevont focisták 81%-ánál figyeltek meg deficitet a figyelem- és memóriefunkciókban, a koncentrációs készségben, valamint a döntéshozó képességben.

Más vizsgálatok azonban az előbbiekkal ellentétes eredményeket hoztak, azaz nem sikerült kimu-

tatni az agysérülés krónikus, hosszú távú jeleit a focisták körében, mikor összehasonlították őket egyéb sporttevékenységet folytató sportolókkal.

Guskiewicz és munkatársai például nem találtak szignifikáns összefüggést a concussiók előtörténet, az iskolai eredmény és a neuropszichológiai kimenetel között főiskolás labdarúgóknál. Továbbá, főiskolás labdarúgókat nem atléta főiskolásokkal és nem focista sportolókkal összevetve sem észleltek jelentős különbséget az iskolai és neurokognitív teljesítmény tekintetében³⁰.

Jordan és kollégái (1996; idézi²) az ismételt fejelésekkel kapcsolatos munkájukban szintén nem találtak statisztikailag jelentős különbséget a megjelenő tünetekben és a mágnesesrezonancia-képalkotás eredményeit illetően az USA Nemzeti Labdarúgó csapatának elit játékosai és a kontrollcsoportok között. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a focisták körében előforduló encephalopathia szorosabb korrelációt mutat az akut fejsérülésekkel, mint az ismétlődő fejelésekkel.

NEUROKÉMIAI VÁLTOZÁSOK

A labdarúgók körében a repetitív fejsérüléssel összefüggő neurokémiai változásokat is több kutató vizsgálta. *Stålnacke* és társai az S100-B (kalciumkötésű fehérje) és NSE (neuronspecifikus enoláz, citoplazmatikus enzim) biomarkerek vérszérumkoncentrációit elemezték férfi labdarúgók esetében mérkőzés előtt és után, a fejelések és az egyéb traumás események számával összefüggésben. Az eredmények azt mutatták, hogy mind a két biomarker koncentrációja jelentősen magasabb volt mérkőzés után, mint mérkőzés előtt, továbbá az S100-B szérumkoncentrációkban bekövetkező változások szignifikánsan korreláltak a mérkőzés alatti fejelések és egyéb traumás, ütközéses események számával¹⁶. Ezeknek a biomarkereknek a megnövekedett szérumkoncentrációi jelzik az agyszövet károsodásának meglétét és súlyosságát, illetve előre jelezhetik a fejsérülés esetleges hosszú távú (például neurokognitív) következményeit, azaz prognosztikus értékkel is bírhatnak^{6, 16}.

Stålnacke és *Sojka* egy későbbi munkájukban azonban a korábbi eredményeket cáfoló következtetésre jutottak az elemzések alapján, amennyiben a kontrollált körülmények közötti fejelés nem okoz növekedést az S-100B szérumkoncentrációkban, mely arra utal, hogy a fejet ért subconcussiv behatások nem eredményeznek biokémiai látható agykárosodást¹⁴.

Zetterberg és munkatársai szintén a fejelés ártalmas hatásait vizsgálták amatőr labdarúgók

körében. Az agyvíz és vérszérum biomarkerszintjeit elemezve (CSF T- τ , NF-L, GFAP és S-100B) kimutatták, hogy a standardizált/kontrollált fejelések nem vezetnek neuronális vagy astroglialis sérüléshez²⁵.

Prevenció

Tekintettel a sportokkal kapcsolatos – legtöbbször enyhe – fejsérülések magas incidenciájára és azok repetitív jellegére, hatékony preventív mérésekre, illetve a sportolók rendszeres szűrő- és kontrollvizsgálatára – beleértve a képalkotó vizsgálatokat is – lenne szükség az arra alkalmas szakemberek (orvosok, neuropszichológusok) bevonásával. Jelenleg még nem teljesen tisztázott, hogy mi az oka az akut, súlyos koponyatrauma és a repetitív minor fejsérülések patomechanizmusában megnyilvánuló különbségnek, mivel azonban eltérő patogenezis húzódik meg a háttérben, más-más tervek van szükség a kezelésre vonatkozóan.

Ugyancsak fontos lenne a védőruházatok (például sisak, kobak, fejevédő) fejlesztése preventív céllal és a játékba való visszatérést szabályozó megfelelő, szigorú irányelvek („return-to-play guideline”-ok) kialakítása/meglévők alkalmazása a különféle – a fejsérülés kockázatának kitett – sportterületeken, a repetitív, így kumulatív hatású concussiók előfordulásának visszaszorítására.

Többféle, széles körben elfogadott protokoll létezik már, melyek a játékba való visszakerüléssel, illetve a concussiók kezelésével kapcsolatos paramétereket foglalják magukba. Ezek közé sorolhatók például a Cantu (1986), a coloradói (1991) és az Amerikai Neurológiai Akadémia (1997) irányelvei^{17, 21}.

Az enyhe baleseti agysérülés mértékéről és méretéről igazából nem adható releváns és megbízható információ és azt az időpontot, amikor a játékos visszatérhet a sporttevékenységhez, legtöbbször a 2008-as zürichi konszenzuson alapuló „Return-to-Play” protokoll szerint határozzák meg jelenleg^{15, 17}. Az egyetlen probléma ezzel a protokollal az, hogy csak abban az esetben hasznos, amikor a beteg tünetei egy bizonyos súlyossági szinten

vannak – azaz egyértelműen azonosítható a concussio¹⁵.

A fiatal sportolók esetében továbbá érdemes lehet a kockázatvállaló tendenciák, attitűdök mérséklését is megcélozni a sérülések minimalizálása érdekében, különböző preventív programok keretében, melyek a kockázatvállalással járó veszélyek tudatosítására összpontosítanak. A prevenciónak összességében négy területre kellene helyeznie a hangsúlyt: elsődlegesen a sérülés/trauma megelőzésére, másodlagosan a sérülés súlyosságának vagy a sérüléssel járó következményeknek az enyhítésére, harmadlagosan a sérülés ismételt előfordulásának kivédésére és végül, negyedsorban az indirekt módszerekre (irányelvek, törvények, védőruhák fejlesztése).

Egy effektív prevenciós programnak tehát mindenképpen multidiszciplináris megközelítésre kellene épülnie és egy komplexebb, integratív modell kellene kialakítania a játékba való visszatéréssel és a concussiók kockázat csökkentésével kapcsolatban, mely mind a belső, mind a külső faktorokat figyelembe veszi.

Összefoglalás

A baleseti koponyasérülések különleges formája a sport kapcsán kialakuló koponyatrauma. Különlegességét nagy eséllyel repetitív jellege, az ismételt koponyatrauma kapcsán potenciálisan kialakuló, kognitív és egyéb károsodásokhoz, végső soron az életminőség és életkilátások romlásához vezető krónikus neuropatológiai folyamatok kialakulásának esélye és a rendkívül magas incidencia mellett az érintettek fiatal kora adja.

Jelenleg sem a sérülés következményeiről, sem a megelőzés módjáról, a káros hosszú távú következmények kivédésének esélyeiről és módszereiről sem rendelkezünk kellő tudással.

Ez az összefoglaló tanulmány a figyelem felkeltését, a sportsérülések komolyan vételének szükségességét hangsúlyozhatja csupán, felhívva a figyelmet az e területen induló klinikai vizsgálatokban való részvételre, a közlemények követésének fontosságára.

IRODALOM

1. Sohlberg MM, Mateer CA. Cognitive rehabilitation, an integrative neuropsychological approach. New York: Guilford Press; 2001.
2. Levy ML, Kasasbeh AS, Baird LC, Amene C, Skeen J,

Marshall L. Concussions in soccer: a current understanding. World Neurosurg 2012;78(5):535-44.
<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2011.10.032>

3. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemio-

- logy and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 2006;21(5):375-8. <https://doi.org/10.1097/00001199-200609000-00001>
4. *Daneshvar DH, Nowinski CJ, McKee AC, Cantu RC.* The epidemiology of sport-related concussion. *Clin Sports Med* 2011;30(1):1-17, vii. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2010.08.006>
 5. *Shenouda C, Hendrickson P, Davenport K, Barber J, Bell KR.* The effects of concussion legislation one year later – what have we learned: a descriptive pilot survey of youth soccer player associates. *PM R* 2012;4(6):427-35. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2012.02.016>
 6. *Undén J, Ingebrigtsen T, Romner B.* Scandinavian guidelines for initial management of minimal, mild and moderate head injuries in adults: an evidence and consensus-based update. *BMC Medicine* 2013;11(1):1-14. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-50>
 7. *Champion AJ.* Neuropsychological Rehabilitation. A resource for group-based education and intervention. John Wiley and Sons Ltd.; 2006.
 8. *Gajawelli N, Lao Y, Apuzzo ML, et al.* Neuroimaging changes in the brain in contact versus noncontact sport athletes using diffusion tensor imaging. *World Neurosurg* 2013;80(6):824-8. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2013.10.020>
 9. *Stern RA, Riley DO, Daneshvar DH, Nowinski CJ, Cantu RC, McKee AC.* Long-term consequences of repetitive brain trauma: chronic traumatic encephalopathy. *PM R* 2011;3(10 Suppl 2):S460-7. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2011.08.008>
 10. *Buki A, Kovacs N, Czeiter E, et al.* Minor and repetitive head injury. *Adv Tech Stand Neurosurg* 2015;42:147-92. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09066-5_8
 11. *Talavage TM, Nauman EA, Breedlove EL, et al.* Functionally-detected cognitive impairment in high school football players without clinically-diagnosed concussion. *J Neurotrauma* 2014;31(4):327-38. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1512>
 12. *Vanderploeg RD, Curtiss G, Belanger HG.* Long-term neuropsychological outcomes following mild traumatic brain injury. *J Int Neuropsychol Soc* 2005;11(3):228-36. <https://doi.org/10.1017/S1355617705050289>
 13. *Guskiewicz KM, Weaver NL, Padua DA, Garrett WE.* Epidemiology of concussion in collegiate and high school football players. *Am J Sports Med* 2000;28(5):643-50.
 14. *Stålnacke BM, Sojka P.* Repeatedly Heading a Soccer Ball Does Not Increase Serum Levels of S-100B, a Biochemical Marker of Brain Tissue Damage: an Experimental Study. *Biomark Insights* 2008;3:87-91.
 15. *Neselius S, Brisby H, Theodorsson A, Blennow K, Zetterberg H, Marcusson J.* CSF-biomarkers in Olympic boxing: diagnosis and effects of repetitive head trauma. *PLoS One* 2012;7(4):e33606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033606>
 16. *Stålnacke BM, Tegner Y, Sojka P.* Playing soccer increases serum concentrations of the biochemical markers of brain damage S-100B and neuron-specific enolase in elite players: a pilot study. *Brain Inj* 2004;18(9):899-909. <https://doi.org/10.1080/02699050410001671865>
 17. *McCrary P, Meeuwisse W, Johnston K, et al.* Consensus statement on concussion in sport – the 3rd International Conference on concussion in sport, held in Zurich, November 2008. *J Clin Neurosci* 2009;16(6):755-63. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.02.002>
 18. *McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, et al.* Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive topathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68(7):709-35. doi: 710.1097/NEN.1090b1013e3181a1099d1503.
 19. *Collins MW, Grindel SH, Lovell MR, et al.* Relationship between concussion and neuropsychological performance in college football players. *JAMA* 1999;282(10):964-70. <https://doi.org/10.1001/jama.282.10.964>
 20. *Guskiewicz KM, Marshall SW, Bailes J, et al.* Association between recurrent concussion and late-life cognitive impairment in retired professional football players. *Neurosurgery* 2005;57(4):719-26; discussion 719-26. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000175725.75780.DD>
 21. *Costanza A, Weber K, Gandy S, et al.* Review: Contact sport-related chronic traumatic encephalopathy in the elderly: clinical expression and structural substrates. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37(6):570-84. doi: 510.1111/j.1365-2990.2011.01186.x.
 22. *Punmoose AR.* Study raises concerns about “heading” in soccer, but jury is still out on risks. *JAMA* 2012;307(10):1012-4. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.231>
 23. *Lipton ML, Kim N, Zimmerman ME, et al.* Soccer heading is associated with white matter microstructural and cognitive abnormalities. *Radiology* 2013;268(3):850-7. <https://doi.org/10.1148/radiol.13130545>
 24. *Baugh CM, Stamm JM, Riley DO, et al.* Chronic traumatic encephalopathy: neurodegeneration following repetitive concussive and subconcussive brain trauma. *Brain Imaging Behav* 2012;6(2):244-54. <https://doi.org/10.1007/s11682-012-9164-5>
 25. *Zetterberg H, Jonsson M, Rasulzada A, et al.* No neurochemical evidence for brain injury caused by heading in soccer. *Br J Sports Med* 2007;41(9):574-7. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2007.037143>
 26. *Tanriverdi F, Unluhizarci K, Coksevim B, Selcuklu A, Casanueva FF, Kelestimur F.* Kickboxing sport as a new cause of traumatic brain injury-mediated hypopituitarism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66(3):360-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02737.x>
 27. *Nemes O, Kovacs N, Czeiter E, et al.* Predictors of post-traumatic pituitary failure during long-term follow-up. *Hormones (Athens)* 2015;14(3):383-91.
 28. *Witol AD, Webbe FM.* Soccer heading frequency predicts neuropsychological deficits. *Arch Clin Neuropsychol* 2003;18(4):397-417. <https://doi.org/10.1093/arclin/18.4.397>
 29. *Matser EJ, Kessels AG, Lezak MD, Jordan BD, Troost J.* Neuropsychological impairment in amateur soccer players. *JAMA* 1999;282(10):971-3. <https://doi.org/10.1001/jama.282.10.971>
 30. *Guskiewicz KM.* No evidence of impaired neurocognitive performance in collegiate soccer players. *Am J Sports Med* 2002;30(4):630.

SURVEILLANCE AND MANAGEMENT OF PATIENTS WITH TUBEROUS SCLEROSIS COMPLEX

András FOGARASI, Zsuzsanna GYORSOK, Tímea BODÓ

Bethesda Children's Hospital, Budapest



English | <http://dx.doi.org/10.18071/isz.70.0097> | www.elitmed.hu

Tuberous sclerosis complex (TSC) is an autosomal dominant disease due to the uncontrolled differentiation, proliferation, and migration of cells in several organs. Clinical expression is highly variable, from mild skin findings and asymptomatic brain lesions to seizures, mental retardation, autism, and potentially fatal kidney, cardiac, or pulmonary disease. Aim of this paper is to summarize the diagnostic criteria, surveillance and therapeutic issues of this multisystemic disorder emphasizing the most important neurological consequences. Presenting the state-of-the-art management recommendations and comparing them with the local protocols, we hope that our review might help in the proper assessment of one of the most important single gene disorder.

Keywords: tuberous sclerosis complex, management guidelines, surveillance, therapy

SCLEROSIS TUBEROSÁS BETEGEK GONDOZÁSA

Fogarasi A, MD, DSc; Gyorsok Z, MD, Bodó T, MD
Ideggyogy Sz 2017;70(3–4):97–103.

A sclerosis tuberosa egy autoszomális dominánsan öröklődő genetikai betegség, mely a legkülönbözőbb szervekben manifesztálódik benignus tumorok, illetve proliferációs zavarok formájában. A fenotípus rendkívül változatos az enyhe bőrtünetektől és tünetmentes idegrendszeri eltérésektől az epilepsziás rohamokon, értelmi fogyatékonyságon, autizmuson át az életet veszélyeztető nefrológiai, cardialis és pulmonológiai szövődményekig. Dolgozatunk célja, hogy összefoglalja e multisisztémás betegség diagnosztikai kritériumait, terápiás lehetőségeit és gondozási feladatait, külön hangsúlyozva a legfontosabb neurológiai vonatkozásokat. A legfrissebb nemzetközi guideline és a hazai protokollok összehasonlításával szeretnénk elérni, hogy minden sclerosis tuberosás beteg megkapja az optimális ellátást hazánkban is.

Kulcsszavak: sclerosis tuberosa, gondozási irányelv, surveillance, terápia

Correspondent: Prof. dr. FOGARASI András, Bethesda Children's Hospital;
1146 Budapest, Bethesda u. 3. E-mail: fog.andras@gmail.com

Érkezett: 2016. november 16. Elfogadva: 2017. január 12.

Tuberous sclerosis complex (TSC) is a multisystem genetic disorder characterized by disrupted differentiation, proliferation, and migration of cells in various organs¹. With an incidence of 1:6.000 live births, it is one of the most important single gene disorder² with up to 1 million patients worldwide³.

Disease expression is highly variable, with mani-

festations ranging from mild skin findings and asymptomatic brain lesions to seizures, mental retardation, autism, and potentially fatal kidney, cardiac, or pulmonary disease^{1,4}. In this paper, our aim is to interpret the diagnostic criteria, surveillance and therapeutic issues of this multiorgan disease emphasizing the most important neurological consequences. We also present the most recent

management recommendations and compare them with the local protocols.

Central nervous system (CNS) manifestation of TSC

Tubers are typically cortical or subcortical hamartomas with increased FLAIR and T2 signal intensity on brain images. Tubers are rarely solitary but usually can be seen as multifocal lesions (**Figure 1**). They are responsible for the most frequent CNS manifestations: *seizures*, *developmental delay* or mental retardation and *autism*. *Subependymal giant cell astrocytoma* (SEGA) can be seen in about 10% of TSC patients⁵, and – according to serial MR images – arise from the very frequent (90%) *subependymal nodules* (SENs). While SENs can be any subependymal lesions, SEGAs are typically located close to the foramen of Monro and might cause cerebrospinal fluid obstruction and hydrocephalus. They typically show contrast-enhancing characteristics and growth on serial images.

Seizures can arise any time during life but a typical form of epilepsy starts in infants in form of *West syndrome*. Epileptic spasm series, cognitive developmental delay and hypsarrhythmia (on EEG) are the classical electroclinical symptoms. Later in childhood or in adults, any type of *focal epilepsies* can appear depending on the localization of the epileptogenic tubers. Vigabatrin is the first-line AED for West syndrome and – beside other classical AEDs – can be helpful in focal epilepsies as well. In case of well-defined epileptogenic tubers far from eloquent regions, epilepsy surgery (removal of the tuber and surroundings) can also be a therapeutical option.

TSC-associated neuropsychiatric disorders (TAND) is a new terminology describing the inter-related functional and clinical manifestations of brain dysfunction common in TSC, including autism spectrum disorders, intellectual disabilities, psychiatric disorders, and neuropsychological deficits as well as school and occupational difficulties⁶. According to the TAND proposal, all patients should receive a comprehensive assessment at diagnosis to determine a baseline for future evaluations and to identify areas requiring early intervention.

Non-CNS manifestation of TSC

Skin manifestations are the most variable symptoms helping the clinical diagnosis of TSC. Facial

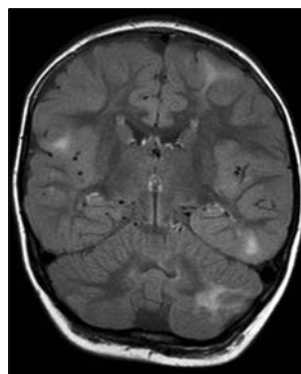


Figure 1. *Multiplex tubers on FLAIR image*



Figure 2. *Facial angiofibromatoma*

angiofibromatosis (or adenoma sebaceum), hypomelanotic macules (sometimes in ash leaf form), shagreen patches, café au lait spots as well as subungual fibromas might be observed (**Figure 2**).

Kidney cysts and *angiomyolipomas* are the clinically most important manifestation occurring in about 80% of TSC patients. Small size cysts – even in polycystic form – usually cause no renal function problems; however, large angiomyolipomas might cause pain, kidney failure or even life-threatening bleedings.

Cardiac rhabdomyomas are more frequent in children and might totally disappear by time. They are frequently diagnosed by fetal ultrasound and can be the first manifestation of the disease. Large rhabdomyomas rarely cause valve insufficiency or even circulatory blocks.

Hamartomatous lesions might be presented in other organs such as *pulmonary lymphangioleiomyomatosis* (LAM; causing sometimes spontaneous pneumothorax) as well as retina patches, bone cysts, dental pits and gum fibromas.

Despite the wide range of pathology seen in TSC, only a few features are responsible for the

Table 1. Clinical diagnostic criteria of TSC after Krueger⁹. Criteria eligible for “definite” or “possible” diagnosis → see in text

Major features
Hypomelanotic macules (≥3, at least 5-mm diameter)
Angiofibromas (≥3) or fibrous cephalic plaque
Cortical dysplasias (including tubers)
Subependymal nodules
Subependymal giant cell astrocytoma
Cardiac rhabdomyoma
Ungual fibromas (≥2)
Shagreen patch
Multiple retinal hamartomas
Lymphangiomyomatosis (LAM)
Angiomyolipomas (≥2)
(A combination of the last two major clinical features (LAM and angiomyolipomas) without other features does not meet criteria for a definite diagnosis.)
Minor features
“Confetti” skin lesions
Dental enamel pits (>3)
Intraoral fibromas (≥2)
Retinal achromic patch
Multiple renal cysts
Nonrenal hamartomas

decreased life expectancy associated with the disease. They are hydrocephalus due to SEGA, drug resistant epilepsies, as well as severe renal (rupturing angiomyolipoma or rare renal cell carcinoma), pulmonary (pneumothorax), and cardiovascular (large rhabdomyoma and aneurysm) diseases⁷. To avoid these possible life-threatening complications and guarantee the best available quality of life, surveillance and proper management are very important for people with TSC. Case manager specialist can depend on the main manifestation of the disease but according to our experiences a neurologist (or child neurologist) has usually the key role in both the diagnosis and management of TSC patients.

Newly diagnosed patients

Diagnosis of TSC is based upon clinical symptoms⁸. The so-called Gomez criteria contains 11 major and 6 minor features. For the “definite” diagnosis of TSC, two major or one major and two minor features should be fulfilled. A “possible” clinical diagnosis can be set up if one major or two minor features are present (see **Table 1** for the list of major and minor criteria).

Beside clinical criteria, identification of either a TSC1 or TSC2 pathogenic mutation in DNA is suf-

ficient to make a definite diagnosis of TSC (pathogenic mutation is a mutation that clearly inactivates the function of the TSC1 or TSC2 proteins or is a missense mutation whose effect on protein function has been established by functional assessment^{10–12}).

These genes encode for hamartin (TSC1) and tuberlin (TSC2), which form a regulatory complex responsible for limiting the activity of an important intracellular regulator of cell growth and metabolism known as mammalian target of rapamycin (mTOR) complex¹². Consequently uncontrolled cell proliferation, migration, and differentiation might be presented in almost any organ.

Management recommendations in TSC

In order to standardize clinical care for people with TSC, an International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference was organized and diagnostic, surveillance, as well as management recommendations were finalized and published in 2013. Here we summarize these recommendations for both newly diagnosed and long-term managed patients completed with some remarks regarding the local protocol.

Guidelines for newly diagnosed patients

Table 2 summarizes the management recommendations for newly diagnosed or suspected TSC individuals. Among these steps one can find some new or less frequently used methods.

TAND (TSC-associated neuropsychiatric disorder) is a checklist of various neurological, behavioral and developmental milestones and psychiatric disorders. This checklist assesses 12 different topics including early development, behavioral and mood problems, intellectual development, educational skills and family concerns (can be downloaded from www.tsalliance.org). Each person with TSC will have their own TAND profile (that might change over time) and the recorded features can help both patients, their families and clinicians to setup priorities for the future.

Another special recommendation is assessing kidney and lung complications by 3D imaging. In Hungary, kidney cysts and AMLs are usually assessed by abdominal ultrasound and MRI is used only in case of large lesions. However, a recent report showed that even large and therefore potentially dangerous AMLs could be hidden on high-resolution ultrasound examination¹³. Therefore

Table 2. *Surveillance and management recommendations for newly diagnosed or suspected tuberous sclerosis complex, after Krueger⁹*

Genetics: Three-generation family history to assess for additional family members at risk of TSC. Genetic testing for family counseling.

Brain: Brain MRI to assess for the presence of tubers, SEN, migrational defects, and SEGA. Evaluate for TSC-associated neuropsychiatric disorder (TAND). During infancy, education of parents to recognize infantile spasms, even if none have occurred at time of first diagnosis. Baseline routine EEG. If EEG and/or TAND are abnormal, follow-up with a 24-hr video-EEG to assess for subclinical seizure activity.

Kidney: Abdominal MRI to assess for the presence of angiomyolipoma and renal cysts. Accurate blood pressure evaluation. Renal function evaluation (GFR).

Lung: Baseline pulmonary function testing. High-resolution chest computed tomography (HRCT) in patients at risk of developing lymphangioleiomyomatosis (LAM): females >18 years and symptomatic males.

Skin/Teeth: Detailed dermatologic and dental exam.

Heart: Echocardiogram to rule out rhabdomyomas. ECG to assess for underlying conduction defects.

Eye: Complete ophthalmologic evaluation, including dilated funduscopy, to assess for retinal lesions and visual field deficits.

Table 3. *Surveillance and management recommendations for patients already diagnosed with definite or possible tuberous sclerosis complex – after Krueger, 2013⁹*

Genetics: Genetic testing and family counseling, if not done previously, in individuals of reproductive age or newly considering having children.

Brain abnormalities: Brain MRI every 1-3 years in asymptomatic TSC patients younger than age 25 years to monitor for new occurrence of SEGA. More frequent MRI in patients with large or growing SEGA, or with SEGA causing ventricular enlargement. Patients with asymptomatic SEGA in childhood should continue to be imaged periodically as adults.

Surgical resection for acutely symptomatic SEGA (shunt may also be necessary). Either surgical resection or medical treatment with mTOR inhibitors may be used for growing but otherwise asymptomatic SEGA.

Screening for TSC-associated neuropsychiatric disorders (TAND) features periodically. Management strategies should be based on the TAND profile of each patient and should be based on guidelines for individual disorders (e.g., autism spectrum disorder, attention deficit hyperactivity disorder, anxiety disorder). Prompt evaluation to look at potential medical causes (e.g., SEGA, seizures, renal disease, medication) in case of sudden behavioral change.

Epilepsy: EEG in individuals with known or suspected seizure activity. Prolonged video-EEG when seizure occurrence is unclear or when unexplained sleep, behavioral changes, or other alteration in cognitive or neurological function is present.

Vigabatrin is the recommended first-line therapy for infantile spasms. ACTH can be used if treatment with vigabatrin is unsuccessful. Anticonvulsant therapy of other seizure types in TSC should generally follow that of other epilepsies. Epilepsy surgery should be considered for medically refractory TSC patients.

Kidney: Abdominal MRI to assess for the progression of angiomyolipoma and renal cystic disease every 1-3 years (all ages). Renal function (including glomerular filtration rate and blood pressure) assessment at least annually.

Embolization for angiomyolipoma with acute hemorrhage. Nephrectomy is to be avoided. For asymptomatic, growing angiomyolipoma measuring larger than 3 cm in diameter, treatment with an mTOR inhibitor. Selective embolization or kidney-sparing resection are acceptable second-line therapy for asymptomatic angiomyolipoma.

Lung: Regular clinical screening for lymphangioleiomyomatosis (LAM) symptoms. High-resolution computed tomography (HRCT) every 5-10 years in asymptomatic individuals at risk of LAM. If lung cysts detected on HRCT - > annual pulmonary function testing and HRCT interval reduced to every 2-3 years. mTOR inhibitors may be used to treat LAM patients with moderate to severe lung disease or rapid progression.

Skin: Detailed clinical dermatologic exam annually. Surgical excision, laser, or possibly topical mTOR inhibitor therapy if necessary.

Teeth: Detailed clinical dental exam at every 6 months and panoramic radiographs by age 7 years to rule out dental and jaw lesions.

Heart: Echocardiogram every 1-3 years in asymptomatic pediatric patients until regression of cardiac rhabdomyomas is documented. ECG every 3-5 years in asymptomatic patients of all ages to monitor for conduction defects.

Eye: Annual ophthalmologic evaluation in patients with previously identified ophthalmologic lesions or vision symptoms.

regular abdominal MRI would be the ideal tool for screening and follow-up of kidney AMLs.

Similarly CT is rarely used for regular screening of lymphangioleiomyomatosis in TSC patients, not even in the highly endangered population of females >18 years. Although it happens infrequently, spontaneous pneumothorax is an important complication of these patients.

Because of the high incidence of epilepsy – especially catastrophic forms such as West syndrome in infants – prolonged video-EEG and education of parents for early recognition of subtle seizures would be crucial. Unfortunately we pay less attention to this essential challenge.

Long-time management of TSC patients

After their diagnosis, TSC patients need regular, at least annual checkups with a detailed screening and follow-up protocol. Local guidelines in Hungary usually contain regular brain MRI and abdominal as well as cardiac ultrasound examinations while abdominal MRI is rarely applied. Additionally, patients sometimes undergo nephrectomy in case of angiomyolipomas with acute hemorrhage and the less invasive selective embolization or kidney-sparing resections are unfortunately less frequently used¹⁴.

New therapeutic approaches in TSC

Key role of the mTOR pathway in its etiology initiated the use of mTOR inhibition as a possible therapy of TSC manifestations. Everolimus is a rapamycin derivative that inhibits the mTOR pathway by inhibiting mTOR kinase activity and downstream pathways¹⁵. Until now, efficacy of the mTOR inhibitor therapy was proved in TSC-associated SEGA, AML and epilepsy.

An international phase III, double-blind, randomized, placebo-controlled trial that evaluated the efficacy and safety of everolimus in 117 TSC patients with SEGA found that 35% of patients on the everolimus arm showed a >50% reduction of SEGA volume from the baseline size (**Figure 3**). It was highly significant because none of the patients on the placebo arm had this response^{16, 17}.

Similarly, reduction of kidney AML volume was assessed in placebo-controlled trials. The angiomyolipoma response rate, defined as the proportion of patients with confirmed >50% reductions in the sum of volumes of all target angiomyolipomas relative to baseline, was 42% for everolimus compared with 0% for placebo being also highly significant¹⁸.

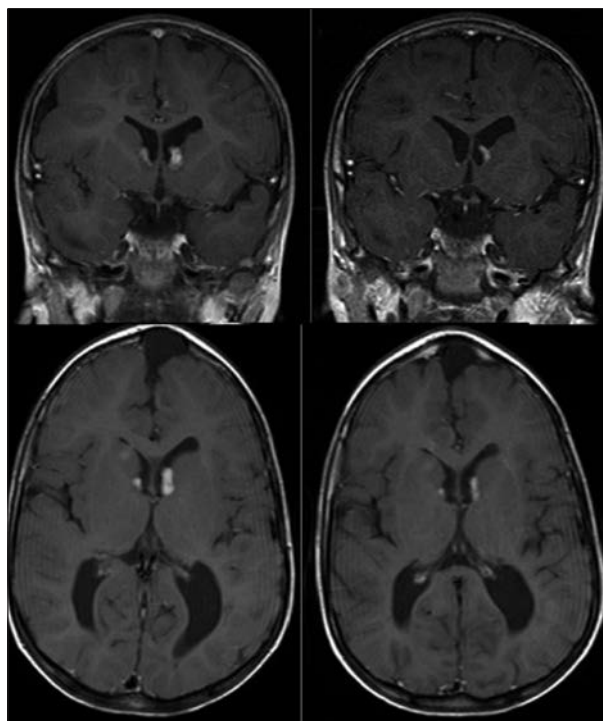


Figure 3. Bilateral SEGA and their reduction after 12 months therapy of everolimus (contrast enhanced T1 coronal and axial images)

Results of the first placebo-controlled, randomized trial on patients with TSC and therapy resistant focal epilepsy were published last year¹⁹. 366 patients were enrolled and randomly assigned to placebo, low-exposure (3–7 ng/mL), or high-exposure (9–15 ng/mL) everolimus and mTOR inhibitor could significantly reduce seizure frequency in both everolimus arms.

As an additional advantage, everolimus had a significant skin lesion response rate in all of these studies decreasing the symptoms of facial angiofibroma. It led to the experimental use of topical everolimus in form of creams with preliminary promising results²⁰. A part of these studies examined the effects of everolimus on neurocognitive function and autistic phenotypes and found positive effect on these fields, too. A human MRI study showed that mTOR inhibitors treatment was able to decrease white matter abnormalities, even if the exact clinical significance of this finding is still unknown²¹.

In all of these clinical trials, everolimus yielded a comparable safety profile. Adverse events were usually mild and grade 1 or 2 in severity^{16–19, 22} being stomatitis and upper respiratory tract infection the most frequent clinical while total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and triglyceride increase the most important laboratory complications²³.

Clinical evidence (recent trials as well as case reports) suggested that everolimus treatment – beside SEGA, AML and epilepsy – can benefit other TSC-associated disease manifestations, such as skin symptoms, pulmonary lymphangiomyomatosis, cardiac rhabdomyomas, and even neurocognitive function^{24, 25}. The positive effects of mTOR inhibition on a wide variety of TSC disease manifestations can make it a potential systemic treatment of TSC in the future²⁶.

TSC Clinics

Because TSC is a multisystemic genetic disorder with variable phenotypes among patients and

changing disease manifestation through their lifespan, it can be challenging to organize a holistic medical care for everyone. Beside surveillance and management guidelines, the International TSC Consensus Conference also established recommendations to standardize a comprehensive approach to all TSC patients regardless of their age and clinical symptoms⁹. Establishment of specialized TSC Clinics is recommended using international guidelines in the diagnostic and therapeutic assessment of this important genetic disorder.

DISCLAIMER

This paper was supported by Novartis. All thoughts reflect the opinion of the authors.

REFERENCES

- Goh S, Butler W, Thiele EA. Subependymal giant cell tumors in tuberous sclerosis complex. *Neurology* 2004; 63:1457-61. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000142039.14522.1A>
- Osborne JP, Fryer A, Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1991;615:125-7. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb37754.x>
- Budde K, Gaedeke J. Tuberous sclerosis complex-associated angiomyolipomas: focus on mTOR inhibition. *Am J Kidney Dis* 2012;59:276-83. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.10.013>
- Franz DN, Bissler JJ, McCormack FX. Tuberous sclerosis complex: neurological, renal and pulmonary manifestations. *Neuropediatrics* 2010;41:199-208. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1269906>
- Cuccia V, Zuccaro G, Sosa F, Monges J, Lubienieky F, Taratuto A. Subependymal giant cell tumor in children with tuberous sclerosis. *Childs Nerv Syst* 2003;19:232-43.
- de Vries P. Neurodevelopmental, psychiatric and cognitive aspects of tuberous sclerosis complex. In: Kwiatkowski DJ, Whittemore VH, Thiele EA (eds.). *Tuberous Sclerosis Complex*. Weinheim: Wiley-Blackwell; 2010:229-68. <https://doi.org/10.1002/9783527630073.ch12>
- Shepherd CW, Gomez MR, Lie JT, Crowson CS. Causes of death in patients with tuberous sclerosis. *Mayo Clin Proc* 1991;66:792-6. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)61196-3](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)61196-3)
- Northrup H, Krueger DA; International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group. Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr Neurol* 2013;49:243-54. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.001>
- Krueger DA, Northrup H; International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group. Tuberous sclerosis complex surveillance and management: recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr Neurol* 2013;49:255-65. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.002>
- Au KS, Rodriguez JA, Rodriguez E Jr, Dobyns WB, Delgado MR, Northrup H. Mutations and polymorphisms in the tuberous sclerosis complex gene on chromosome 16. *Hum Mutat* 1997;9:23-9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)9:1<23::AID-HUMU4>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:1<23::AID-HUMU4>3.0.CO;2-Q)
- Ali J BM, Sepp T, Ward S, Green AJ, Yates JRW. Mutations in the TSC1 gene account for a minority of patients with tuberous sclerosis. *J Med Genet* 1998;35:969-72. <https://doi.org/10.1136/jmg.35.12.969>
- Huang J, Dibble C, Matsuzaki M, Manning B. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex. *Mol Cell Biol* 2008;28:4104-15. <https://doi.org/10.1128/MCB.00289-08>
- Kaiser O, Wedegärtner S, Lutz S, Hoyer PF, Schara U. Superiority of Renal MRI to Ultrasound in Children with Tuberous Sclerosis Complex (TSC): Detecting of Renal Angiomyolipomas (AML) with Elevated Risk of Bleeding. *Neuropediatrics* 2016;47:FV02-02. DOI: 10.1055/s-0036-1583715. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1583715>
- Reusz G, Deak-Pal A, Rempert A. A sclerosis tuberosa terápiajának és gondozásának újabb aspektusai. *Hypert Nephrol* 2016;20:97-144.
- Houghton PJ. Everolimus. *Clin Cancer Res* 2010;16:1368-72. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1314>
- Franz DN. Everolimus in the treatment of subependymal giant cell astrocytomas, angiomyolipomas, and pulmonary and skin lesions associated with tuberous sclerosis complex. *Biologics* 2013;7:211-21.
- Franz DN, Belousova E, Sparagana S, Bebin EM, Frost M, Kuperman R, et al. Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): a multicentre, randomised, placebocontrolled phase 3 trial. *Lancet* 2013; 381:125-32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61134-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61134-9)
- Bissler JJ, Kingswood JC, Radzikowska E, et al. Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangiomyomatosis

- (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2013;381:817-24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61767-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61767-X)
19. French JA, Lawson JA, Yapici Z, Ikeda H, Polster T, Nabbout R, et al. Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset seizures associated with tuberous sclerosis (EXIST-3): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* 2016 Sep 6. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31419-2. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31419-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31419-2)
 20. Dill PE, De Bernardis G, Weber P, Löscher U. Topical everolimus for facial angiofibromas in the tuberous sclerosis complex. A first case report. *Pediatr Neurol* 2014; 51:109-13. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.02.016>
 21. Tillema JM, Leach JL, Krueger DA, Franz DN. Everolimus alters white matter diffusion in tuberous sclerosis complex. *Neurology*. 2012;78:526-31. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318247ca8d>
 22. Krueger DA, Care MM, Agricola K, Tudor C, Mays M, Franz DN. Everolimus long-term safety and efficacy in subependymal giant-cell astrocytoma. *Neurology* 2013;80: 574-80. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182815428>
 23. Fogarasi A, De Waele L, Bartolini G, Jozwiak S, Laforgia N, Verhelst H, et al. EFFECTS: an expanded access program of everolimus for patients with subependymal giant cell astrocytoma associated with tuberous sclerosis complex. *BMC Neurol* 2016;16:126. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0658-4>
 24. Randell E, McNamara R, Davies DM, Owen-Jones E, Kirby N, Angel L, Drew C, et al. The use of everolimus in the treatment of neurocognitive problems in tuberous sclerosis (TRON): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* 2016;17:398. <https://doi.org/10.1186/s13063-016-1446-6>
 25. Kilincaslan A, Kok BE, Tekturk P, Yalcinkaya C, Ozkara C, Yapici Z. Beneficial Effects of Everolimus on Autism and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in a Group of Patients with Tuberous Sclerosis Complex. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2016 Oct 31. <https://doi.org/10.1089/cap.2016.0100>
 26. Moavero R, Coniglio A, Garaci F, Curatolo P. Is mTOR inhibition a systemic treatment for tuberous sclerosis? *Ital J Pediatr* 2013;39:57. <https://doi.org/10.1186/1824-7288-39-57>

A HORÁNYI TÁRSASÁG HÍREI

A Horányi Béla Klinikai Idegtudományi Társaság 2016. december 13-i közgyűlésén új vezetőséget választott. A Társaság elnöke dr. Folyovich András, titkára dr. Béres-Molnár Katalin Anna lett. A főtitkár továbbra is dr. Döme László. A vezetőség tagja dr. Abonyi Eszter és dr. Dudás Eszter (az utóbbi ifjúsági felelősként a fiatal szakemberekkel való kapcsolattartást kapta kiemelt feladatául). Döntés született arról, hogy dr. Lipcsey Attila professzor úr a Horányi Társaság örökös, dr. Stipula Magda főorvos asszony tiszteletbeli elnöki címet kap. 2016. december 30.

Dr. Folyovich András,
a Horányi Béla Klinikai Idegtudományi Társaság elnöke

A CSALÁDORVOSOK ALVÁSI APNOÉVAL KAPCSOLATOS ISMERETEI ÉS ATTITÚDJEI. MEGVALÓSUL-E AZ OSAS SZŰRÉSE A JÁRMŰVEZETŐK EGÉSZSÉGI ALKALMASSÁGÁNAK VIZSGÁLATA SORÁN?

CSATLÓS Dalma¹, FERENCI Tamás², KALABAY László¹, LÁSZLÓ Andrea¹, HARGITTAY Csenge¹, MÁRKUS Bernadett¹, SZAKÁCS Zoltán³, TORZSA Péter¹

¹Semmelweis Egyetem, ÁOK, Családorvosi Tanszék, Budapest

²Óbudai Egyetem, Neumann János Informatikai Kar, Élettani Szabályozások Csoport, Budapest

³MH Egészségügyi Központ, Budapest



Hungarian | <http://dx.doi.org/10.18071/isz.70.0105> | www.elitmed.hu

HUNGARIAN FAMILY PHYSICIANS' AND RESIDENTS' KNOWLEDGE OF AND ATTITUDE TOWARDS OSAS (OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA SYNDROME). DO THEY SCREEN SLEEP APNEA DURING THE GENERAL MEDICAL CHECKUP FOR THE DRIVING LICENCE?

Csatlós D, MD; Ferenci T, PhD; Kalabay L, MD, PhD; László A, MD; Hargittay C, MD; Márkus B, MD; Szakács Z, MD, PhD; Torzsa P, MD, PhD

Ideggyogy Sz 2017;70(3–4):105–113.

Célkitűzés – Az obstruktív alvási apnoe szindróma (OSAS) kezelés nélkül súlyos cardiovascularis, cardiorespiratoricus, neurológiai és egyéb szövődményekhez vezethet, felismerésében fontos szerepe van a családorvosnak. A vizsgálat célja családorvosok alvási apnoéval kapcsolatos ismereteinek és attitűdjének a felmérése. Megvalósul-e az OSAS szűrése a járművezetők egészségi alkalmasságának vizsgálata során?

Módszer – Keresztmetszeti vizsgálat során a validált OSAKA kérdőívet alkalmaztuk kötelező szinten tartó tanfolyamon, melyet további négy saját kérdéssel egészítettünk ki.

Eredmények – 116 családorvos és 103 családorvos-rezidens töltötte ki a kérdőívet. A magyar családorvosoknak, különösen a férfi orvosoknak hiányos az ismerete az alvási apnoéről. Az orvosnők átlagos pontszáma szignifikáns mértékben magasabb volt a férfiakénál ($13,4 \pm 1,8$ vs. $11,7 \pm 2,6$, $p=0,005$). Minél több szakvizsgálata volt az orvosnak, annál magasabb volt az elért pontszám, a nulla vagy egy szakvizsgálattal rendelkezők $12,5 \pm 2,3$ pontot, a két szakvizsgálattal rendelkezők $12,7 \pm 2,2$ pontot, a három vagy négy szakvizsgálattal rendelkezők $14,0 \pm 2,1$ pontot értek el ($p=0,05$). A rezidensek átlagpontszáma $12,1 \pm 2,4$ pont volt, ami magasabb a családorvosok átlagpontszámánál ($p=0,012$). A rezidenseknél is a nőknek magasabb az átlagpontszáma ($12,6 \pm 2,0$ vs. $11,3 \pm 2,7$; $p=0,008$). A praxis nagysága (kártyaszáma), helye és típusa, valamint az orvos életkora

Objective – Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) without treatment can cause serious cardiovascular, cardiorespiratory, neurological and other complications. Family physicians have an important role in recognizing the disease. The aim of the study is to assess the knowledge and attitude of family physicians related to sleep apnea. Whether OSAS screening is realized during the general medical checkup for drivers.

Methods – In the cross-sectional study we used a validated OSAKA questionnaire in mandatory continuous medical education courses, supplemented with four additional questions.

Results – 116 family physicians and 103 family medicine residents filled out the questionnaire. Hungarian family physicians, especially male doctors lack the adequate knowledge of sleep apnea. The average score of female physicians was significantly higher than that of males (13.4 ± 1.8 vs. 11.7 ± 2.6 , $p=0.005$). The more specializations the doctor has, the higher the score. Zero or one special examination holders reached 12.5 ± 2.3 points, two special examination holders reached 12.7 ± 2.2 points, three or four special examination holders reached 14.0 ± 2.1 ($p=0.05$). Residents' average score was 12.1 ± 2.4 points, which is higher than that of family doctors ($p=0.012$). Female residents also had higher average points than male residents (12.6 ± 2.0 vs. 11.3 ± 2.7 ; $p=0.008$). The size, location and

Levelező szerző (correspondent): Dr. TORZSA Péter, Semmelweis Egyetem, ÁOK, Családorvosi Tanszék;
1125 Budapest Kútvolgyi út 4. E-mail: torzsa.peter@med.semmelweis-univ.hu
<http://orcid.org/0000-0002-8148-4961>

Érkezett: 2016. december 20. Elfogadva: 2017. február 23.

szerint nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést az elért pontszámmal.

Regressziós vizsgálatunk szerint a modellben szereplő változókra korrigálva is összefüggés látható az orvos neme és ismeretei között, de nincs összefüggés az életkor, a szakvizsgák száma, illetve a BMI és az orvosok ismeretei között. Az attitűdpontszámokat tekintve a nők átlagos pontszáma magasabb volt a férfiakéhoz képest ($3,5 \pm 0,6$ vs. $2,9 \pm 0,6$, $p < 0,001$). A 16/2015. (III. 30.) EMMI rendelet ellenére csak a praxisok 39%-ában végzik rendszeresen az OSAS-szűrést a gépjárművezetői engedélyhez szükséges orvosi vizsgálat részeként.

Következtetések – Az OSAS magas prevalenciája és klinikai jelentősége ellenére a családorvosok gyakran nem ismerik fel az alvási apnoét, nehézséget okoz a betegek gondozása.

Kulcsszavak: alvási apnoe, attitűd, elméleti ismeret, családorvos, rezidens, OSAKA kérdőív

type of the practice or the doctor's age did not show any statistically significant correlation with the number of points achieved.

According to our regression analysis, corrected to variables in the model, we found correlation between gender and medical knowledge, but there was no correlation between age, number of specialties, body mass index and the theoretical knowledge of the doctors. In terms of attitude female GPs had higher average scores than male GPs (3.5 ± 0.6 vs. 2.9 ± 0.6 , $p < 0.001$). Despite the modification of the 13/1992 regulation only 39% of the practices carried out regularly the required OSAS screening as part of the medical examination for a driving licence.

Conclusions – Despite the high prevalence and clinical importance of OSAS, GPs often do not recognize sleep apnea and they have difficulty in treating their patients for this problem.

Keywords: sleep apnea, attitudes, theoretical knowledge, family physicians, residents, OSAKA questionnaire

Bevezetés

Az obstruktív alvási apnoe szindróma (OSAS) a leggyakoribb alvás alatti légzészavar, kiemelt fontosságú kórkép az alvászavarok körében. Az össznépeségben gyakorisága 2–4% és legfontosabb jellemzője a felső légutak alvás alatti ismétlődő, részleges vagy teljes elzáródása, amely oxigéndeszaturációt okoz és ébredésre vezethet. A klinikai kép megjelenése igen komplex. Az OSAS az alvás alatti obstruktív légzési események és a kifejezett nappali álomosság, aluszékonyosság együttes fennállását jelenti. Egyre több kutatás támasztja alá, hogy a kórkép számos súlyos cardiovascularis betegség (terápiarezisztens hypertonia, szívinfarktus, stroke) önálló rizikófaktorának tekinthető. Depresszió, szorongás, diabetes, GERD, memóriazavar és egyéb betegségek esetén is gondolnunk kell erre a betegségre^{1–4} és az OSAS gyakran csökkent életminőséget okoz a betegnek.

Az OSAS okozta fokozott nappali aluszékonyosság 8-10-szeresére növeli a munkahelyi, otthoni és közúti balesetek gyakoriságát. Vezetés közbeni álomosság szempontjából kiemelten veszélyeztetettek a serdülőkorú-fiatal felnőtt gépjárművezetők (életviteli szokások, krónikus alvásmegvonás), a különböző alvászavarokban szenvedők (elsősorban alvászűrő légzészavar, krónikus insomnia, narcolepsia), továbbá a hivatásos gépjárművezetők. *Arbus* 18–70 éves gépjárművezetők – 110 fő – súlyos következményekkel járó elalvásos balesetét dolgozta fel, és 31%-uknál talált OSAS-t a baleset hátterében⁵. *Pack* és munkatársai az elalvásos köz-

RÖVIDÍTÉSEK

ABPM (Ambulatory Blood Pressure Monitor):

24 órás vérnyomás-monitorozás

AHI: apnoe-hypopnoe index

CPAP (Continuous Positive Airway Pressure):

folyamatos pozitív nyomású légzéstámogatás

ESS (Epworth Sleepiness Scale): Epworth Álomossági Skála

OSAKA: Obstructive Sleep Apnea Knowledge and Attitudes

OSAS: Obstruktív Alvási Apnoe Szindróma

úti balesetek 30–35%-ának hátterében igazoltak OSAS-t, mely 43–56 milliárd dollár teljes gazdasági kárt okozott⁶. *Powell* és munkatársai vizsgálata szerint a kezeletlen, közepes vagy súlyos fokú alvási apnoe szindrómában szenvedő betegek pszichomotoros teljesítménye rosszabb, mint akik véralkoholszintje 0,6 ezrelék⁷.

Az obstruktív alvási apnoe felismerésében fontos szerepe van a családorvosnak és ezt a szerepet tovább erősíti a 16/2015. (III. 30.) EMMI rendelet, mely a jogosítvány megújításához szükséges egészségügyi alkalmassági vizsgálat részeként az alvás közbeni légzészavar kiszűrését. Azon kérelmezőket, akiknél fiziológiai jellemzőik alapján felmerül a mérsékelt vagy súlyos OSAS gyanúja, alvászavar-szűrővizsgálatra kell beutalni és addig a jogosítvány nem hosszabbítható meg. A mérsékelt vagy súlyos obstruktív alvási apnoe szindrómával

diagnosztizált betegeknél pedig alvásdiagnosztikai központban kiállított szakorvosi vélemény szükséges arról, hogy az állapotuk megfelelő ellenőrzés alatt áll és a szükséges kezelés során kapott utasításokat betartják. Az egyes alkalmassági csoportba tartozó alvási apnoében szenvedő betegeknek háromévente, a hivatásos jogosítvánnyal rendelkezőknek pedig évente alvásdiagnosztikai központban végzett orvosi felülvizsgálaton kell részt venniük, amelynek célja annak megállapítása, hogy a beteg betartja-e a kezelés során kapott utasításokat, szükséges-e a kezelés folytatása^{8,9}.

A CSALÁDORVOSOK ALVÁSI APNOÉVAL KAPCSOLATOS ISMERETEI

Az OSAS magas prevalenciája és klinikai jelentősége ellenére, a családorvosok gyakran nem rendelkeznek elég ismerettel ahhoz, hogy felismerjék a megbetegedést^{10, 11}, pedig a családorvosok fontos szerepet játszanak az OSAS szűrésében. *Rosen* és munkatársai is az OSAS alacsony mértékű felismerését találták mind a területen dolgozó családorvosok, mind az egyetemi intézményhez tartozó családorvosok körében (0,1% és 3,1% a két csoportban)¹², pedig az OSAS országos prevalenciája Amerikában a nőknél 9%, a férfiaknál 24%¹³.

Módszer

A családorvosok alvási apnoéval kapcsolatos ismereteinek felmérésére az OSAKA kérdőívet¹⁴ használtuk, amelyet két szakfordító segítségével fordítottunk magyar nyelvre, majd megtörtént a kérdőív visszafordítása és összehasonlítása az eredeti kérdőívvel. Az ismereti kérdőív összpontszáma objektíven meghatározható a kérdésekre adott válaszokból (helyes válasz 1 pont, helytelen 0 pont), az attitűdre vonatkozó Likert-skála pontszáma pedig nem összeadással, hanem az értékek átlaga alapján került elemzésre.

Az OSAKA egy önállóan kitöltendő kérdőív, amelynek kitöltése kevesebb mint 10 percet igényel. A kérdőív 18 igaz-hamis, OSAS-val kapcsolatos állításból áll, amely a következő tárgykörökre épült: 1. epidemiológia, 2. patofiziológia, 3. klinikum, 4. diagnózis és 5. kezelés. A válaszok között szerepelt egy harmadik, „nem tudom” lehetőség is, annak érdekében, hogy minimálisra csökkentsük a válaszadók találgatásának hatását. Minden „nem tudom” válasz helytelen válasznak számított.

További öt állítás az orvosok attitűdjével foglalkozik, öt pontos Likert-skálán kell bejelölniük az OSAS fontosságát és az OSAS-ban szenvedő bete-

gek felismerésében, kezelésében és gondozásában való magabiztosságukat.

A kérdőív kiegészítéseként még négy, általunk kidolgozott kérdést tettünk fel a családorvosoknak:

1. Szűri-e az OSAS-t jogosítvány hosszabbításakor?

2. Ha igen, akkor milyen módszerrel szűri a betegeket?

3. Ha nem szűri, akkor mi ennek az oka?

4. Az Ön praxisában jelenleg hány alvási apnoe szindrómában szenvedő beteg van?

A kérdőív kitöltésén kívül demográfiai adatokat (nem, életkor, szakvizsgák száma, praxis helye és nagysága, BMI) is gyűjtöttünk az orvosokról.

Összesen 119 gyakorló családorvos töltötte ki a kérdőívet kötelező szinten tartó tanfolyam előtt 2016 novemberében és 103 családorvos központi gyakornokunk. Három családorvos hiányosan töltötte ki a kérdőívet, így 116 kérdőívet tudunk értékelni. A válaszadási arány 75% volt, a kérdőív kitöltése anonim volt. A rezidensek hiánytalanul töltötték ki a kérdőívet.

A VIZSGÁLATOKBAN ALKALMAZOTT STATISZTIKAI MÓDSZEREK

A folytonos változókat átlag \pm szórás, a kategoriális változókat gyakoriság (arány) formában adtuk meg. Az OSAKA ismereti összpontszámot folytonos változónak tekintettük.

A folytonos változók összefüggését a kétkimenetű kategoriális változókkal (például nem), Mann–Whitney-féle U-próbával, a több kimenetű kategoriális változókkal (például szakvizsgák száma), Kruskal–Wallis-próbával, a folytonos változókkal (például életkor), Kendall-korrelációval vizsgáltuk.

A többváltozós modellezéshez lineáris regressziót használtunk. A folytonos változók szerinti linearitást korlátozott köbös spline-okkal ellenőriztük, de interakciót nem tételeztünk fel a változók között. A modell bootstrap-pel validáltuk belsőleg, és hasonlóképp vizsgáltuk a kalibrációját is.

A statisztikai elemzéseket R környezet (3.3.2-es verzió) alatt végeztük¹⁵ egy erre a célra fejlesztett szkript segítségével, mely a levelező szerzőnél elérhető.

Eredmények

Összesen 223 kérdőívet tudunk kiértékelni, közülük 116 fő volt gyakorló családorvos és 103 fő családorvos-rezidens. A válaszadó családorvosok átlagos életkora 55 ± 11 év (tartomány: 30–74), 63%-uk ($n=74$) volt nő. A nők átlagéletkora 53 ± 9 év, a férfiaké 55 ± 9 év volt. A családorvos-rezidensek átlag-

1. táblázat. A családorvosok és praxisuk jellemzői

	%	(n)
Nemek aránya (116)		
Nő	64	(74)
Férfi	36	(42)
Életkor (116)		
Nő	53±9	(74)
Férfi	55±9	(42)
<40	13,8	16
40–60	51,7	60
>60	34,5	40
Szakvizsgák száma (107)		
0	0,9	(1)
1	47,7	(51)
2	39,3	(42)
3	10,2	(11)
4	1,9	(2)
A praxis típusa (114)		
Felnőtt	80,7	(92)
Gyermek	6,1	(7)
Vegyes	13,2	(15)
A praxis helye (114)		
Budapest	44,7	(51)
Megyeszékhely	12,3	(14)
Város	19,3	(22)
Falu	23,7	(27)
Kártyaszám (114)		
0–1000	2,6	(3)
1001–1500	27,2	(31)
1501–2000	40,4	(46)
2001–2500	21,9	(25)
>2500	7,9	(9)
BMI kg/m ² (113)		
<25,0	39,8	(45)
25,0–29,9	42,5	(48)
30–35,0	15,0	(17)
>35,0	2,7	(3)

gos életkora 30±6 év (tartomány: 25–51), 60%-uk (n=63) volt nő. A gyakorló családorvosoknál az átlagos praktizálási idő 21±11 év (1–45) volt, az átlagos praxis nagyság 1810 fő (medián: 1705 fő), 51%-uk kettő vagy több szakvizsgával rendelkezik. A minta többi tulajdonsága az **1. táblázatban** található.

A családorvosok a 18 pontból minimum 4, maximum 17 pontot értek el, átlagpontszámuk 12,8±2,3 volt. A családorvosok ismereti pontszámának megoszlása a különböző demográfiai jellemzők szerint a **2. táblázatban** található.

Az orvosnők átlagpontszáma szignifikáns mértékben magasabb volt a férfiakénál (13,4±1,8 vs. 11,7±2,6, p=0,005). A szakvizsgák száma szerint is különbözött az átlagpontszám, minél több szakvizsgája volt az orvosnak, annál nagyobb volt az elért

2. táblázat. A családorvosok ismereti pontszámának megoszlása a különböző demográfiai jellemzők szerint

Nem (n)	Ismereti pontszám	p
Nő (74)	13,4±1,8	0,0004
Férfi (42)	11,7±2,6	
Életkor (n)		0,11*
<40 (16)	13,1±2,2	
40–60 (60)	12,9±2,5	
>60 (40)	12,6±2,0	
Szakvizsgák száma (n)		0,05
0–1 (52)	12,5±2,3	
2 (42)	12,7±2,2	
3–4 (13)	14,0±2,1	
Praxis típusa		0,28
Felnőtt (92)	12,7±2,4	
Gyermek (7)	12,4±1,7	
Vegyes (15)	13,6±1,7	
A praxis helye		0,89
Budapest/megyeszékhely (65)	12,8±2,2	
Város (22)	12,5±2,8	
Falu (27)	13,1±2,0	
Kártyaszám		0,10*
<1500 (33)	12,8±1,9	
1501–2000 (46)	12,6±2,3	
>2001 (34)	13,1±2,5	
BMI kg/m ²		0,01*
<25,0 (45)	13,5±2,2	
25,0–29,9 (48)	12,2±2,3	
30– (20)	12,9±1,8	

* a p-érték a yers adatok alapján került kiszámításra, a kategorizálást csak az eloszlás deskriptív szemléltetéséhez használtuk

pontszám, a nulla vagy egy szakvizsgával rendelkezők 12,5±2,3 pontot, a két szakvizsgával rendelkezők 12,7±2,2 pontot, a három vagy négy szakvizsgások 14,0±2,1 pontot értek el (p=0,05).

BMI szerint a 25 kg/m² alatti csoportban volt a legmagasabb az átlagpontszám (13,5±2,2), míg a 25 és 30 közötti BMI-vel rendelkező orvosok 12,2±2,3, a 30 fölöttiek 12,9±1,8 pontot értek el (p=0,07).

A praxis nagysága (kártyaszáma), helye és típusa, valamint az orvos életkora szerint nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést az elért pontszámmal.

A rezidensek átlagpontszáma 12,1±2,4 pont volt, mely magasabb volt a családorvosokénál (p=0,012). A 18 pontból minimum 5, maximum 17 pontot értek el. A rezidenseknél is a nőknek magasabb volt az átlagpontszáma (12,6±2,0 vs. 11,3±2,7; p=0,008).

A következő öt kérdésnél volt a legnagyobb a helytelen válaszok számaránya a családorvosok körében: A CPAP-kezelés nazális vérbőséget okoz-

3. táblázat. A családorvosok ismereteinek regressziós analízise. A függő változó az összpontszám

	Regressziós koefficiens (95%-os CI)	p-érték
Nem (nő vs. férfi)	+1,59 (+0,68±2,51)	0,001
Életkor (+1 év)	-0,0179 (-0,058±0,022)	0,38
BMI (+1 kg/m ²)	-0,0176 (-0,13±0,094)	0,75
Szakvizsgák száma		
2 vs. ≤1	+0,176 (-0,73±1,09)	0,15
≥3 vs. ≤1	+1,26 (-0,02±2,54)	

hat (83%); A lézeres uvuloplasztika megfelelő kezelési mód súlyos obstruktív alvási apnoe esetében (84%); Az uvulopalatofaringoplasztika meggyógyítja az obstruktív alvási apnoe betegek többségét (69%); Felnőtteknél óránként kevesebb mint öt apnoe vagy hypopnoe normálisnak számít (66%). Nők esetében az OSAS egyetlen tünete lehet a krónikus fáradtság (44%).

A rezidenseknek a következő öt kérdést volt a legnezebb helyesen megválaszolniuk és a rossz válaszok számaránya a következő volt: Az uvulopalatofaringoplasztika meggyógyítja az obstruktív alvási apnoe betegek többségét (88%); Felnőtteknél óránként kevesebb mint öt apnoe vagy hypopnoe normálisnak számít (84%); A CPAP-kezelés nasalis vérbőséget okozhat (69%); A lézeres uvuloplasztika megfelelő kezelési mód súlyos obstruktív alvási apnoe esetében (68%); Férfiak esetében a 43 centiméternél vagy annál nagyobb nyakkörfogat kapcsolatban áll az obstruktív alvási apnoéval (38%).

Elvégeztük az adatok többváltozós elemzését is, hogy az esetleges confounding ellen védekezzünk. A **3. táblázatban** a családorvosok ismereteinek regressziós analízise látható, a függő változó az összpontszám (a modell minden folytonos változójában lineárisnak bizonyult, $p=0,1221$). A regressziós vizsgálat szerint a modellben szereplő változókra korrigálva is összefüggés látható az orvos neme és ismeretei között, de nincs összefüggés az életkora, szakvizsgáinak száma, illetve BMI-je és az ismeretei között.

A modell magyarázóereje csekély (validált $R^2=0,099$), de jól kalibrált.

A CSALÁDORVOSOK OSAS KLINIKAI JELENTŐSÉGÉVEL ÉS KEZELÉSÉVEL KAPCSOLATOS ATTITÚDJÉ

Az attitűdpontszámokat tekintve minden kérdésnél a nők átlagpontszáma magasabb volt, az összesített átlagpontszámuk $3,5\pm0,6$ volt szemben a férfiak $2,9\pm0,6$ értékével, ez a különbség statisztikailag igen szignifikáns volt ($p<0,001$). A statisztikai

4. táblázat. A családorvosok attitűdjének korrelációi az orvos jellemzőivel (Kendall-féle tau)

A1–2	τ	p-érték
Életkor, év	-0,0487	0,4878
Praxisban eltöltött idő	-0,0135	0,8493
BMI, kg/m ²	-0,0734	0,2961
A3–5	τ	p-érték
Életkor, év	-0,0217	0,7462
Praxisban eltöltött idő	-0,0202	0,767
BMI, kg/m ²	-0,0709	0,2917

elemzésnél nemcsak az öt kérdésre vonatkozó összesített pontszámot vizsgáltuk, hanem külön elemeztük a fontosságra vonatkozó első két kérdés (A1–2), illetve a magabiztosságra vonatkozó 3–5. kérdés összesített pontszámát is (A3–5). A nők az OSAS fontossági kérdésekre (A1–2) tendenciaszerűen magasabb pontszámot adtak ($4,3\pm0,7$ vs. $3,5\pm0,7$, $p<0,001$). A magabiztosságra vonatkozó kérdések esetében (A3–5) is volt különbség nők és a férfiak között ($3,0\pm0,8$ vs. $2,5\pm0,7$; $p=0,0096$), bár mindkét nem esetében alacsony volt ez a pontszám.

Az orvosok életkora, praxisban eltöltött ideje és BMI-értéke nem korrelált sem a fontossági (A1–2), sem a magabiztossági kérdésekkel (A3–5) (**4. táblázat**).

A családorvos-rezidensek összesített attitűdpontszáma alacsonyabb volt, mint a gyakorló családorvosok átlagpontszáma ($3,0\pm0,5$ vs. $3,3\pm0,6$; $p=0,002$). A rezidenseknél a nők és férfiak között nem találtunk szignifikáns különbséget az OSAS felismerésével és kezelésével kapcsolatban ($3,1\pm0,5$ vs. $3,0\pm0,5$; $p=0,431$). Arra a kérdésre, hogy egy 1500 fős praxisban hány alvási apnoe szindrómás beteg lehet, a válaszok medián értéke 35 fő volt. Saját praxisukban átlagosan öt alvási apnoe-ban szenvedő beteget említettek az orvosok, 40%-uknak öt alatt van az OSAS-betegek száma, a praxisok 10%-ban egyáltalán nincs OSAS-beteg. Az orvosok 44%-a használ OSAS szűrésre szolgáló kérdőívet praxisában. A jogszabály ellenére a praxisok 15%-ban egyáltalán nem szűrik, 46%-ban néha szűrik az OSAS-t gépjárművezetői engedélyhez szükséges orvosi vizsgálat során. Csak a praxisok 39%-ában dolgozó családorvosnál rutinszerűen része az OSAS-szűrés a szakértői tevékenységnek.

A családorvosok 59%-a említett OSAS-szűréshez használt módszert, legtöbbször szűrőkérdőívet használnak (44%), 8%-uk rögtön szomnológus segítségét kéri, néhány orvos csak az anamnézis (4%) vagy heteroanamnézis (1%) segítségével szűri az OSAS-t. A 24 órás vérnyomás-monitorozást

5. táblázat. Az OSAKA és az OSAKA-KIDS kérdőívekkel kapott eredmények összehasonlítása. Az értékek átlag \pm SD formában vannak feltüntetve

	USA OSAKA 2002	USA OSAKA- KIDS 2005	Törökország OSAKA- KIDS 2006	Latin-Amerika OSAKA 2013	Nigéria OSAKA 2016	Magyarország OSAKA 2016
Résztvevők száma	135	497	208	367	273	116
Válaszadási arány (%)	49	43	–	65	38	75
Életkor (évek)	45 \pm 10	46 \pm 10	35 \pm 7	45 \pm 11	33 \pm 10	55 \pm 11
Férfi (%)	73	56	49	47	50	37
Csaláadorvosok aránya (%)	16	27	30	100	14	100
Csaláadorvosok helyes válaszainak aránya (%)	78	68	61	60	59	71
Csaláadorvosok teljes attitűdjé az ötpontos skálán	3,3 \pm 0,8	2,9 \pm 0,6	3,2 \pm 0,6	–	3,3 \pm 0,5	3,3 \pm 0,9

(ABPM) mint szűrési lehetőséget csak egy családorvos említette, holott Ádám és munkatársai igazolták ennek hasznosságát hypertóniás betegek körében¹⁶.

Rákérdeztünk arra is, hogy mi az oka annak, hogy nem szűrjük az OSAS-t a gépjárművezető-engedélyhez szükséges orvosi vizsgálat során. A családorvosok legtöbbször az időhiányt, a felismerés nehézségét válaszolták a kérdésünkre. Megemlítették még azt is, hogy nem ismernek az OSAS szűrésére használható kérdőívet és eddig nem is gondoltak a betegség szűrésének fontosságára a családorvosi praxisukban.

Megbeszélés

A 16/2015. EMMI rendelet a jogosítvány megújításához szükséges egészségügyi alkalmassági vizsgálat részévé tette az alvás közbeni légzésszavar kiszűrését, melyet családorvos vagy foglalkozás-egészségügyi szakorvos végezhet. Vizsgálatunkban célul tűztük ki a családorvosok tudásának és attitűdjének a felmérését az OSAS betegséggel kapcsolatban. Tanulmányunkban az OSAKA kérdőívet használtuk, melyet Schotland és munkatársai fejlesztették ki¹³ orvosok felnőttkori obstruktív apnoéval kapcsolatos tudásának és attitűdjének felmérése céljából. A kérdőívet a validálás során 135 orvos töltötte ki az Amerikai Egyesült Államokban, 51%-uk belgyógyász, 37%-uk gyermekorvos, 16%-uk családorvos volt. Az OSAS-ra vonatkozó ismeretek terén nem találtak különbséget a nemek között, de a szakképesítés jelentősen befolyásolta az eredmények alakulását: a legtöbb helyes választ a belgyógyászok és a családorvosok adták, míg a gyermekorvosok szignifikánsan kevesebb kérdésre feleltek

helyesen (a jó válaszok átlaga belgyógyászoknál 14,3; családorvosoknál 14; gyermekgyógyászoknál 11,3 pont volt). Az attitűdökre vonatkozó kérdéseket illetően a férfi orvosok magabiztosabbnak mutatkoztak ($p<0,05$), és ez esetben is a gyermekorvosok érték el a legkisebb pontszámot ($p<0,001$). Az életkor függvényében csökkent az OSAS-ra vonatkozó ismeretek mennyisége ($p<0,001$) és romlott az attitűd ($p<0,05$). A praxisban töltött évek számával ugyancsak csökkent a tudást felmérő 18 kérdésre kapott pontok száma ($p<0,001$). Az OSAS-ra vonatkozó tudás és attitűd szoros összefüggést mutatott egymással.

Mivel az OSAS cardiovascularis betegségekre is hajlamosít és a kardiológiai osztályokon az alvási apnoe aluldiagnosztizált, nem meglepő, hogy az OSAKA kérdőív e területen hiányosságokat mutatott a kardiológusok tudásában. Ezért született meg a kérdőív módosítása után a speciálisan a kardiológusok ismereteire és attitűdjeire irányuló kérdőív¹⁷. Az eredeti OSAKA-ban szereplő kérdésekre hasonló arányú helyes válasz született (76%). Az életkor, a specializálódás iránya és a nemek közötti különbség ebben a vizsgálatban nem befolyásolta az eredmények alakulását.

A családorvosok körében az OSAKA kérdőívet korábban további öt alkalommal használták tudás-felmérésre és az OSAS klinikai jelentőségével és kezelésével kapcsolatos attitűd megítélésére. Az összehasonlító **5. táblázatunkból** kitűnik, hogy a gyermekek körében az orvosok kevésbé gondolnak az obstruktív alvási apnoe előfordulására, az ismereti pontszám a felnőtt betegekhez viszonyítva magasabb. A törökországi eredmények¹⁸ jobbnak bizonyultak az amerikai OSAKA-KIDS¹⁹ kérdőívben elért eredményeknél, de ezt a különbséget okozhatta a vizsgált orvoscsoport átlagos életkorá-

nak különbsége is ($46 \pm 10,5$ vs. 35 ± 7). A táblázatból látható, hogy magyar családorvosok körében kapott eredményeink nem rosszabbak a külföldi tanulmányokban találtakhoz képest, sőt a helyes válaszok aránya az amerikai eredmények után hazánkban volt a második legjobb (71%). A legalacsonyabb válaszadási arányt Nigériában²⁰ és Latin-Amerikában²¹ találták.

Az OSAS nagymértékben aluldiagnosztizált²². Az OSAKA kérdőív segítségével arra kerestük a választ, hogy mely okok játszhatnak szerepet abban, hogy az OSAS gyakran nem kerül időben felismerésre.

A női családorvosoknál magasabb volt a helyes válaszok aránya (75%), mint a férfi családorvosoknál (72%), bár korábbi vizsgálatok nem találtak jelentős különbséget a két nem között^{23, 24}. A különbség magyarázata lehet talán a két nem közötti korkülönbség (a nők két évvel fiatalabbak voltak), valamint az, hogy a kettő vagy több szakvizsgálóval rendelkezők aránya magasabb volt a nők között (56,27% vs. 37,2%).

A kérdéseket külön-külön elemezve a gyakorló családorvosok a legalacsonyabb pontszámokat az OSAS diagnosztikus kritériumával (AHI index) és a kezeléssel (uvuloplasztika, CPAP) kapcsolatban érték el. Ezzel is magyarázható talán az, hogy a családorvosok ritkábban küldik az OSAS-gyanús betegeket alváslaborba, mint ami indokolt volna.

Vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns kapcsolatot az orvosok életkora és OSAS-sal kapcsolatos ismereteik között, de az életkor előrehaladtával csökkent az orvosok által elért átlagpontszám. Korábban már napvilágot láttak olyan tanulmányok, amelyek összefüggéseket tártak fel az életkor és az ismeretek között: Minél idősebb volt az orvos, annál kevésbé ismerte az ajánlásokat olyan állapotokról, mint a HIV terjedése, illetve a fertőzés megelőzése²⁵. Más tanulmányok összefüggéseket tártak fel az orvosok életkora és a gyakorlati terápiás módszerei között is: Az idősebbek kevésbé ragaszkodnak az útmutatókhoz²⁴, a prevencióval kapcsolatos tanácsadáshoz²³, az egészséges életmódra történő neveléshez és betegségek megelőzésével kapcsolatos szakmai ajánlásokhoz²⁵. Úgy gondoljuk – és ezt más irodalom is alátámasztja –, hogy ez a fiatalabb orvosok legújabb (és naprakész) orvosi oktatását tükrözi.

Minél több szakvizsgálója volt az orvosnak, annál nagyobb volt az elért pontszáma, amit magyarázhat a sokkal több kötelező szinten tartó tanfolyam és a több szakvizsgálóval rendelkező orvos tudásvágya is.

A felnőttpraxisban dolgozók magasabb pontszámot értek el, mint a gyermekpraxisban dolgozó kollégák, de a kapott eredmény nem volt szignifikáns.

Véleményünk szerint indokolt lenne az OSAKA-KIDS¹⁹ gyermekorvosok körében történő kitöltése, hiszen az OSAS gyermekkorban is gyakori, prevalenciája 1,2–5,7% között van. Bármely életkorban előfordulhat a légzészavar, leggyakoribb 2–5 éves korban és legtöbbször nagyon jól gyógyítható. A gyermekorvosoknak így szintén fontos szerepe van az OSAS kiszűrésében.

Korábbi vizsgálatunkban a magasabb BMI-jű családorvosoknál rosszabb attitűdöt találtunk az elhízás kezelésével kapcsolatban²⁶. Jelen vizsgálatunkban nem találtunk szoros összefüggést az orvosok BMI-je és az orvosok OSAS-sal kapcsolatos tudása, attitűdje között. Nagyobb BMI esetén alacsonyabb ismereti pontszámot észleltünk; ám ez a kapcsolat többváltozós elemzésben megszűnt; ennek oka, hogy szerepét átvette a nem: a női orvosok lényegesen alacsonyabb BMI-vel rendelkeznek átlagosan, mint férfi kollégáik.

A családorvos-rezidensek átlagpontszáma szignifikánsan magasabb volt a családorvosok átlagpontszámához képest, de náluk is szükség volna gyakorlatorientált oktatásra (alváslabor-látogatás, videófilm). Az attitűd pontszámuk hasonló a gyakorló családorvosokéhoz, tehát náluk is szükség volna esetbemutatókra, hogy magabiztosabbak legyenek az OSAS felismerésével és kezelésével kapcsolatban.

A fontosságra és a magabiztosságra vonatkozó pontszámot összehasonlítva azt láthatjuk, hogy a családorvosok viszonylag elismerik az OSAS fontosságát, de korántsem magabiztosak a mindennapi gyakorlatban a betegség felismerésével és kezelésével kapcsolatban.

A családorvosok alacsonyabb ismereti pontszáma megmagyarázhatja azt az eredményt, hogy alulbecsülték az OSAS-ban szenvedő betegek prevalenciáját egy átlagos családorvosi praxisban. Egy átlagos 1500 fős családorvosi praxist tekintve súlyos OSAS körülbelül 30–60 beteget érint. Jóllehet, ilyen előfordulási ráta mellett e zavarok felismerése mindenképpen az alapellátás feladata lenne, a kiszűrt és ténylegesen kezelt betegek száma jelenleg ennek csak töredéke, vizsgálatunkban a családorvosok átlagosan öt alvási apnoében szenvedő beteget említettek. Nagy probléma, hogy sok praxisban a jogszabály ellenére egyáltalán nem szűrik az OSAS-t és így a családorvos csak a betegséghez gyakran társuló szövődményeket, társbetegségeket kezeli. Az OSAS szűrésére szolgáló kérdőívek használatának hiánya is nehezíti a betegek felismerését az alapellátásban.

Már számos újabb keletű tanulmány felvetette az orvosok továbbképzésének szükségességét, hogy időben felismerjék az OSAS-ban szenvedő

betegeket és az ajánlásoknak megfelelő kezelésben részesítsék őket^{10–12}. Ennek a továbbképzésnek érintenie kellene a betegséggel foglalkozó összes orvosi szakmát, de különösen a felismerésben aktívan részt vevő családorvosok²⁷, gyermekorvosok²⁸, foglalkozás-egészségügyi szakorvosok²⁹, kardiológusok¹⁷, fogászok³⁰ képzését kellene megerősíteni.

A családorvosok OSAS-betegséggel kapcsolatos ismeretének fejlesztésében alkalmazható lenne az Európában egyre jobban elterjedt internet alapú oktatás (e-learning), amely újszerűségével felkeltethetné az orvosok figyelmét. Ez azért is fontos, mivel a családorvosoknak fontos szerep jut nemcsak az OSAS kiszűrésében, de a diagnosztizált betegek kezelésében és gondozásában is. Ennek a gondozásnak pedig az egyik része a CPAP-terápia megfelelő alkalmazása és a szükséges kontrollvizsgálatok követése.

Kutatásunk legfontosabb limitációja, hogy a felhasznált minta kényelmi minta volt, nem tudhatjuk, hogy mennyiben reprezentatív a magyar családorvosok összességére nézve. Hasonlóképp limitáció, hogy számos tesztet végeztünk, ám ezek eredményét nem korrigáltuk a többszörös összehasonlítások helyzetére nézve.

A kis elemszám miatt nagyobb elemszámú vizsgálatot tervezünk, hogy pontosabban feltérképezzük a családorvosok tudását az alvási apnoéről és megismerjük véleményüket az OSAS szűrésével és kezelésével kapcsolatban, hiszen a családorvosnak fontos szerepe van az OSAS-gyanús gépjárművezetők kiszűrésében, majd az így felállított OSAS-gyanút az alváslaboratóriumban végzett polyszomnográfias vizsgálat igazolhatja. Néha nehéz meggyőzni a beteget a vizsgálat szükségességéről, de a jogszabály megjelenése óta könnyebben rávehetők a kiszűrt betegek, hogy vállalják kivizsgálásukat és kezelésüket. Továbbra is javasoljuk, hogy magas rizikójú betegeknél (obesitas, terápiarezisztens vagy nondipper hypertonia, szívelégtelenség, szívritmuszavar, korábbi stroke, diabetes) az orvos-beteg találkozáskor a családorvos feltétlenül kérdezzen rá az alvás minőségére, elalvásra, nappali aluszékonyságra, fáradtságra, horkolásra és OSAS-gyanú esetén időben kezdje el a beteg kivizsgálását.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ferenci Tamást az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-16-4/III kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja támogatta.

IRODALOM

1. Torzsa P, Novák M, Mucsi I, Ádám Á, Kalabay L. A családorvos szerepe az obstruktív alvási apnoe kiszűrésében, felismerésében. *Orvosi Hetilap* 2008;48:2283-90. <https://doi.org/10.1556/OH.2008.28424>
2. Torzsa P, Kalabay L, Ádám Á, Novák M, Mucsi I. Az obstruktív alvási apnoe klinikai jelentősége, a családorvos szerepe a betegek kezelésében, valamint gondozásában. *Orvosi Hetilap* 2010;42:1725-33. <https://doi.org/10.1556/OH.2010.28948>
3. Nagayoshi M, Punjabi NM, Selvin E, Pankow JS, Shahar E, Iso H, et al. Obstructive sleep apnea and incident type 2 diabetes. *Sleep Med* 2016;25:156-61. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2016.05.009>
4. Acker J, Richter K, Piehl A, Herold J, Ficker JH, Niklewski G. Obstructive sleep apnea (OSA) and clinical depression-prevalence in a sleep center. *Sleep Breath* 2016; Oct 5. [Epub ahead of print] <https://doi.org/10.1007/s11325-016-1411-3>
5. Arbus L, Tiberge M, Serres A, Rouge D. Drowsiness and traffic accidents. Importance of diagnosis. *Neurophysiol Clin* 1991;21:39-43. [https://doi.org/10.1016/S0987-7053\(05\)80354-5](https://doi.org/10.1016/S0987-7053(05)80354-5)
6. Pack AI, Pien GW. How much do crashes related to obstructive sleep apnea cost? *Sleep* 2004;27:369-70.
7. Powell NB, Riley RW, Schechtman KB, Blumen MB, Dinges DF, Guilleminault C. A comparative model: reaction time performance in sleep-disordered breathing versus alcohol-impaired controls. *Laryngoscope* 1999;109:1648. <https://doi.org/10.1097/00005537-199910000-00019>
8. Szakács Z, Ádám Á, Annus János K, Csatlós D, László A, Kalabay L, et al. A Magyar Alvásdiagnosztikai és Terápiás Társaság módszertani ajánlása a közúti járművezetők egészségi alkalmasságának vizsgálatához az obstruktív alvási apnoe szindróma vonatkozásában. *Orvosi Hetilap* 2016;23:892-900. <https://doi.org/10.1556/650.2016.30451>
9. Csatlós D, Szakács Z, Ádám Á, Annus J, László A, Kalabay L, et al. Hogyan kivitelezhető az Obstruktív Alvási Apnoe Szindróma szűrése az alapellátásban? *Háziorvos Továbbképző Szemle* 2016;3:191-5.
10. Haponik EF, Frye AW, Richards B, Wymer A, Hinds A, Pearce K. Sleep history is neglected diagnostic information. Challenges for primary care physicians. *J Gen Intern Med* 1996;11:759-61. <https://doi.org/10.1007/BF02598994>
11. Kramer NR, Cook TE, Carlisle CC, Corwin RW, Millman RP. The role of the primary care physician in recognizing obstructive sleep apnea. *Arch Intern Med* 1999;159:965-8. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.9.965>
12. Rosen RC, Zozula R, Jahn EG, Carson JL. Low rates of recognition of sleep disorders in primary care: comparison of a community-based versus clinical academic setting. *Sleep Med* 2001;2:47-55. [https://doi.org/10.1016/S1389-9457\(00\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S1389-9457(00)00043-5)

13. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993;328:1230-5. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304293281704>
14. Schotland HM, Jeffe DB. Development of the obstructive sleep apnea knowledge and attitudes (OSAKA) questionnaire. *Sleep Med* 2003;4:443-50. [https://doi.org/10.1016/S1389-9457\(03\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S1389-9457(03)00073-X)
15. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. letöltve 2016.12.16.
16. Ádám Á. ABPM a non-dipper hypertonia és OSAS szűrésében – Szűrési modell az alapellátásban. *Családorvosi Fórum* 2012;12:12-4.
17. Southwell C, Moallem M, Auckley D. Cardiologist's knowledge and attitudes about obstructive sleep apnea: a survey study. *Sleep Breath* 2008;12:295-302. <https://doi.org/10.1007/s11325-008-0170-1>
18. Tamay Z, Akcay A, Kilic G, Suleyman A, Ones U, Guler N. Are physicians aware of obstructive sleep apnea in children? *Sleep Med* 2006;7:580-4. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2006.04.004>
19. Uong EC, Jeffe DB, Gozal D, Arens R, Holbrook CR, Palmer J, et al. Development of a measure of knowledge and attitudes about obstructive sleep apnea in children (OSAKA-KIDS). *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005;159(2):181-6. <https://doi.org/10.1001/archpedi.159.2.181>
20. Ozoh OB, Ojo O, Iwuala SO, Akinkugbe AO, Desalu OO, Okubadejo NU. Is the knowledge and attitude of physicians in Nigeria adequate for the diagnosis and management of obstructive sleep apnea? *Sleep Breath*. 2016; Sep 12. [Epub ahead of print] <https://doi.org/10.1007/s11325-016-1407-z>
21. Ojeda IC, Jeffe DB, Guerrero T, Ronnie M, Ilka S, Gustavo G. Attitudes and knowledge about obstructive sleep apnea among Latin American primary care physicians. *Sleep Med* 2013;14:973-7. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.06.005>
22. Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1217-39. <https://doi.org/10.1164/rccm.2109080>
23. Gemson DH, Colombotos J, Elinson J, Fordyce EJ, Hynes M, Stoneburner R. Acquired immunodeficiency syndrome prevention. Knowledge, attitudes, and practices of primary care physicians. *Arch Intern Med* 1991;151:1102-8. <https://doi.org/10.1001/archinte.1991.00400060046008>
24. Kenny SJ, Smith PJ, Goldschmid MG, Newman JM, Herman WH. Survey of physician practice behaviors related to diabetes mellitus in the U.S. Physician adherence to consensus recommendations. *Diabetes Care* 1993;16:1507-10. <https://doi.org/10.2337/diacare.16.11.1507>
25. Schwartz JS, Lewis CE, Clancy C, Kinoshian MS, Radany MH, Koplan JP. Internists' practices in health promotion and disease prevention. A survey. *Ann Intern Med* 1991; 114:46-53. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-114-1-46>
26. Rurik I, Torzsa P, Ilyés I, Szigethy E, Halmy E, Iski G, et al. Primary care obesity management in Hungary: evaluation of the knowledge, practice and attitudes of family physicians. *BMC Fam Pract* 2013;14:798. <https://doi.org/10.1186/1471-2296-14-156>
27. Reuveni H, Tarasiuk A, Wainstock T, Ziv A, Elhayany A, Tal A. Awareness level of obstructive sleep apnea syndrome during routine unstructured interviews of a standardized patient by primary care physicians. *Sleep* 2004;27: 1518-25.
28. Owens JA. The practice of pediatric sleep medicine: results of a community survey. *Pediatrics* 2001;108:E51. <https://doi.org/10.1542/peds.108.3.e51>
29. Kitamura T, Yoshida M, Morimoto Y, Narui K, Tsuda T, Kikuchi H, et al. Surveillance of industrial physicians' knowledge and concern about sleep apnea syndrome]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2005;108:20-6. <https://doi.org/10.3950/jibiinkoka.108.20>
30. Bian H, Smith CL. Development of a questionnaire to assess dentists' knowledge, opinion, education resources, physician cooperation, and clinical practice regarding obstructive sleep apnea (OSAQ-D). *Sleep Breath* 2006;10:76-82. <https://doi.org/10.1007/s11325-005-0045-7>

A SZKIZOFRÉNIA MULTILÓKUSZ GENETIKAI VIZSGÁLATA AZ IDEGFEJLŐDÉS ÉS AZ IMMUNRENDSZER ZAVARÁNAK OKI SZEREPÉRE UTAL(HAT)

PULAY Attila József¹, KOLLER Júlia², NAGY László³, MOLNÁR Mária Judit¹, RÉTHELYI János^{1,4},
a Magyar SCHIZOBANK Konzorcium munkatársai

¹Semmelweis Egyetem, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika, Budapest

²Semmelweis Egyetem, Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézete, Budapest

³Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

⁴MTA-SE NAP-B Molekuláris Pszichiátriai és in vitro Betegségmodellezési Kutatócsoport, Budapest



Hungarian | <http://dx.doi.org/10.18071/isz.70.0115> | www.elitmed.hu

MULTILOCUS GENETIC ANALYSIS IMPLICATES NEURODEVELOPMENT AND IMMUNE SYSTEM IN THE ETIOLOGY OF SCHIZOPHRENIA

Pulay AJ, MD; Koller J, MD; Nagy L, MD, PhD, DSc; Molnár MJ, MD, PhD, DSc; Réthelyi JM, MD, PhD, colleagues of the Hungarian SCHIZOBANK Consortium
Ideggyogy Sz 2017;70(3–4):115–126.

Háttér – A szkizofrénia multifaktoriális, csak részlegesen ismert etiológiájú pszichiátriai zavar, melyet magas heritabilitás (örökletesség) és genetikai heterogenitás jellemez. A multilókuszos genetikai vizsgálatok csökkenthetik a heterogenitás hatását, javítva a vizsgálatok közötti replikáció esélyét.

Célkitűzés – Vizsgálatunkat kettős céllal végeztük: 1. Megvizsgáltuk a rendelkezésünkre álló mintákban a szkizofrénia genetikai hátterét multilókuszos-asszociációs tesztekkel, valamint 2. meghatároztuk a multilókuszos tesztek replikációs valószínűségét, eltérő szerkezetű mintákat alkalmazva.

A vizsgálat alanyai – Explorációs minta: DSM-IV szerint szkizofréniával diagnosztizált betegekből és egészséges szüleikből álló triók (n=16), replikációs minta: szkizofrén betegek és egészséges alanyok eset-kontroll mintája (n=5337).

Módszerek – Kétféle elemzésünkben az egyedi polimorfizmusok asszociációjából a régióalapú gén- és gén-szett-asszociációt, feldúsulást és funkcionális annotációs klaszterek feldúsulását elemeztük. Az explorációs minta p<0,1 asszociációit teszteltük a replikációs mintán, a replikációt többszörös összehasonlításra korrigáltuk.

Eredmények – A génapú tesztek és a kanonikus útvonal-tesztek közül nem találtunk p-érték-korrekción után is szignifikáns asszociációt. A pozicionális génszettek közül 14q31, 5q31 és Xq13 szegmensek esetén korrekció után is szignifikáns asszociációt, illetve feldúsulást észleltünk (p_{corr}: 0,002, 0,006 és 0,048). A funkcionális annotációs klaszter-elemzésben a splicing/alternatív splicing, idegfejlődés és embrionális fejlődés klaszterei bizonyultak korrekció után is

Background – Schizophrenia is a severe psychiatric disorder of poorly understood etiology, characterized by high heritability, multifactorial inheritance and high heterogeneity. Multilocus association methods may reduce the genetic heterogeneity and improve the probability of replication between analyses.

Objectives – The aims of our study were twofold: 1. To analyse genetic risk factors of schizophrenia by using multilocus genetic tests. 2. To assess the replication probability attributable to the various multilocus tests.

Subjects – Discovery set: case-parent trios of unaffected parents and affected probands with a DSM-IV schizophrenia diagnosis (n=16); replication set: schizophrenia cases and unaffected controls (n=5337).

Methods – Associations of single nucleotide and indel markers were transferred to gene- and geneset-based associations, furthermore to geneset-enrichment tests and functional annotation cluster analyses in a two-staged designs. Associations with p<0.1 from the discovery set were tested in the replication sample. Familywise p-value correction for multiple comparisons were performed during the replication step.

Results – After correction for multiplicity, no significant association or enrichment were detected for gene-based nor canonical pathway analyses, but significant association of the 14q31 cytoband and enrichments of the 5q31 and Xq13 cytobands were found (p_{corr}: 0.002, 0.006 and 0.048, respectively). Functional annotation clustering yielded

Levelező szerzők (correspondents): dr. PULAY Attila József, dr. RÉTHELYI János, Semmelweis Egyetem, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika; 1083 Budapest, Balassa u. 6. Telefon: (06-1) 210-0330, fax: (06-1) 210-0336. E-mail: pulay.attila@med.semmelweis-univ.hu, rethelyi.janos@med.semmelweis-univ.hu
<http://orcid.org/0000-0003-2602-3027>
<http://orcid.org/0000-0002-3641-012X>

Érkezett: 2016. november 21. Elfogadva: 2017. január 12.

szignifikánsnak. A szignifikáns replikációk valószínűsége a teszt összetettségével javult (P_{rep} : 0, 0,015, 0,21).

Következtetés – Multilókuszos genetikai elemzésünk megerősítette az idegfejlődés, szinaptikus plaszticitás és immunrendszer érintettségét a szkizofréniában. A multilókuszmód-szerekkel növelhető a replikáció valószínűsége, még jelentősen eltérő minták esetében is.

Kulcsszavak: szkizofrénia, multilókuszos-szekvenenciaanalízis, új generációs szekvenálás, teljesgenom-asszociációs vizsgálat

statistically significant enrichment scores for clusters of splicing/alternative splicing, neurodevelopment and embryonic development. Improvements in replication probability were found with increased test complexity (P_{rep} : 0, 0.015, 0.21).

Conclusions – Our results corroborate the involvement of neurodevelopment, synaptic plasticity and immune mechanisms in the etiology of schizophrenia. Also, our findings indicated improvement of replication probability by using multilocus genetic analyses.

Keywords: schizophrenia, multilocus sequence analysis, high-throughput sequencing, genomewide association study

A szkizofrénia komplex neuropszichiátriai zavar, amelyet fiatal felnőttkorban induló, és többnyire visszatérő, gyakran krónikussá váló pszichotikus epizódok jellemeznek, a pszichés funkciók és az életminőség jelentős, gyakran progresszív károsodását eredményezve. Változatos tüneti képe ellenére prevalenciája világszerte 0,5–1,2% között mérhető, amely kultúrától független, döntően biológiai eredetre utal. Ezzel egybecsengő a család- és iker-vizsgálatok közel 50 éve ismert eredményei, amelyek a szkizofrénia magas heritabilitását ($h^2 \sim 0,8$) mutatták ki. Mindezek a pszichiátriai zavarokra általánosan jellemző, multifaktoriális, poligénis öröklődést valószínűsítették szkizofréniában is¹.

A szkizofrénia teljesgenom-asszociációs vizsgálatok (genome-wide association study, GWAS) első hulláma azonban rámutatott a komplex fenotípusok teljesgenom asszociációs elemzésének általános problémájára: a genotipizált, gyakori egyedi nukleotid polimorfizmusok (single nucleotide polymorphism, SNP) asszociációi általában nagyon kis hatáserősségűek (OR : 1,05–1,1), jóval alacsonyabban a vizsgálatok tervezésekor becsült $OR > 1,3$ hatáserősségnél. Az első vizsgálatok ezért csak néhány szignifikáns markert azonosítottak, asszociációikat többnyire nem replikálták a későbbi vizsgálatok, és az általuk kifejezett genomikus heritabilitás a szegregációs elemzések értékének töredékét érte csak el (2–7%)². Ez alól kivételt jelent a 6p21–22 lókuszos, a major hisztokompatibilitási (MHC) régió, melynek asszociációját szkizofréniával minden GWAS-vizsgálat megerősítette³.

A gyenge replikációs valószínűség egyik oka a lókuszos (genotípus) -heterogenitásban keresendő, amely az egyedi nukleotid variánsokat sokkal nagyobb mértékben érinti, mint a régiókat, biológiai

útvonalakat, génhálózatokat. A multifaktoriális öröklésmenttel jellemezhető betegségeket – így a pszichiátriai zavarok többségét is – magas lókuszos és fenotípus-heterogenitás jellemzi. A biológiai, molekuláris funkciók, vagy kromoszómán való elhelyezkedés, esetleg a kódolt fehérjék kölcsönhatása alapján csoportosított gének elemzése során alacsonyabb heterogenitást feltételezhetünk, és az ilyen típusú elemzés az eredményt rögtön funkcionális kontextusba helyezi. Azonban e módszerek érvényessége nagyban függ az alkalmazott annotációk minőségétől, azaz a genom egyes szakaszainak génekhez, géncsoportokhoz és génen belüli funkciókhoz (génpromoter, enhancer, aktívan átíródó szakasz) való kapcsolásának, a genom „jelölésének” pontosságától. Az annotációs adatbázisok gyors bővülése mellett a hiányos genomikus lefedettség (üres, ismeretlen szakaszok a genomon belül)⁴ és az annotációs redundancia (ismétlődő, átfedő vagy egymásnak ellentmondó annotációs megjelölés)⁵ egyszerre fordul elő.

A szkizofrénia esetében is számos GWAS-, expressziós profil- és teljesgenom-kópiaszámvariáció (CNV) -vizsgálat útvonalelemzése történt korábban, esetenként egymásnak ellentmondó eredményekkel⁶. A glutamáttranszmisszió, szinaptikus plaszticitás, axon- és neuronfejlődés, transzkripció- és sejtosztódás-szabályozás útvonalainak eltéréseit több vizsgálat is bemutatta szkizofréniában, bár a legnagyobb elemszámmal rendelkező Psychiatric Genomics Consortium (PGC) ilyen típusú vizsgálata nem talált többszörös összehasonlítás korrekciója után sem szignifikáns útvonal-asszociációt³.

Jelen vizsgálatunkban ezekből kifolyólag a szkizofrénia genetikai hátterének vizsgálatára törekedünk gén- és génszettelalapú multilókuszos-asszociáci-

1. táblázat. A vizsgálat mintái és az alkalmazott elemzési típusok

Jellemző	Explorációs minta	Replikációs minta	
forrástanulmány	SCHIZOBANK	GAIN SCZ*	MGS SCZ**
elérési kód	–	phs000021.v3.p2	phs000167.v1
teljes minta (eset-kontroll)	n=16 (trió)	n=2787 (1318:1469)	n=2935 (1405:1530)
elemzett minta (eset-kontroll)	n=16	n=5337 (2632:2705)	
genotipizálás	teljes exom szekvenálás	Affymetrix Genomwide 1M csip	
genotipizált SNV/SNP	120 719	716 923	
száma minőségkontroll után			
SNP száma imputáció után	–	7 942 021	
SNP-alapú elemzés (szoftver)	Family-Based Association Test	logisztikus regresszió***	
géalapú asszociációs teszt (szoftver)	Kiterjesztett Simes' teszt, GATES (KGG v3.5)	Kiterjesztett Simes' teszt, GATES (KGG v3.5)	
génszettalapú asszociációs teszt (szoftver)	Hybrid Set-based Test, HYST (KGG v3.5)	Hybrid Set-based Test, HYST (KGG v3.5)	
génszettalapú feldúsulás teszt (szoftver)	Wilcoxon előjeles rangszámösszeg teszt (KGG v3.5)	Wilcoxon előjeles rangszámösszeg teszt (KGG v3.5)	
funkcionális annotációs klaszterelemzés	DAVID 6.8, közepes szigorúság	DAVID 6.8, közepes szigorúság	
DAVID-variáns és génpriorizáció	KGGseq splicing, mendeli és komplex patogenitás predikció vagy EIGEN > 1,5	KGGseq splicing, mendeli és komplex patogenitás predikció vagy EIGEN > 1,5	

* GAIN SCZ: Genetics Information and Association Network, Genome-Wide Association Study on Schizophrenia

** MGS SCZ: Molecular Genetics of Schizophrenia

*** logisztikus regressziós modell életkor, nem és populációs főkomponensekre (PCA) kontrollálva

ós és feldúsulási teszteket végezve. Másodsorban felmértük, hogy milyen mértékben változtatják a replikáció valószínűségét különböző komplexitású multilokus genetikai módszerek egymástól jelentősen eltérő minták esetében.

Módszerek

VIZSGÁLATI MINTÁK

Vizsgálatunkban három, egymással nem átfedő mintát elemeztünk, amelyeket kétlépcsős szerkezetben, explorációs, valamint replikációs mintaként elemeztünk (**1. táblázat**). Kutatásunk explorációs mintáját a SCHIZOBANK vizsgálat⁷ (n=16) eset-szülő triója alkotta, mindegyik trió DSM-IV szkizofréniával diagnosztizált utód és a két, szkizofréniával nem diagnosztizált, egészséges szülő mintájából állt. A DSM-IV-TR szerinti szkizofrénia diagnózist a Structured Interview for Clinical Studies (SCID) strukturált diagnosztikus interjú segítségével állítottuk fel, leggyakoribb diagnózis a nem differenciálható szkizofrénia volt (n=10). A SCHIZOBANK multicentrikus vizsgálat 18 és 60 év közötti, szkizofréniával diagnosztizált beteg és egészséges kontrollszemélyek mintájának biobankolására

jött létre, kizárási kritériumot a bevonás idején fennálló, aktív droghasználat vagy alkoholabúzus és -függőség, vagy más neurológiai betegség jelentett.

Vizsgálatunk replikációs mintája a National Center for Biotechnology Information (NCBI) database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP) tudományos közösség számára hozzáférhető, teljesgenom-adatbázisának két szkizofrénia-GWAS eset-kontroll vizsgálatából származott. A Genetic Association Information Network (GAIN) Genome-Wide Association Study on Schizophrenia⁸ (azonosító: phs000021.v3.p2, n=2787) és a Molecular Genetics of Schizophrenia⁹ (azonosító: phs000167.v1.p1, n=2935) európai származású résztvevőiből vontuk össze a teljes replikációs mintát (n=5722, $n_{SCZ}=2723$, $n_{KONT}=2725$, és 274 ismeretlen fenotípusú egyén). A szkizofrénia diagnózisának felállítására mindkét mintában legalább két, gyakorlott klinikus egybehangzó vizsgálati lelete alapján került sor, beválasztásra azon 18 éves vagy idősebb, szkizofrénia vagy szkizoaffektív zavar DSM-IV-TR kritériumait teljesítő alanyok kerültek, akiket a vizsgálat szervezői legalább két éve ismertek. Kizárási kritériumok közé az angol nyelv nem elégséges ismerete, a pszichotikus tünetek hátterében szerhasználat vagy neurológiai betegség fenn-

állása, illetve súlyos mentális retardáció tartozott. Az adattisztítás lépései során kizártuk a hiányzó fenotípusú, kevert származásúnak, valamint rejtett rokonságban állónak bizonyuló egyéneket ($n=5337$, $n_{\text{SCZ}}=2632$, $n_{\text{KONT}}=2705$).

GENOTIPIZÁLÁS, MINŐSÉG-ELLENŐRZÉS ÉS IMPUTÁCIÓ

A SCHIZOBANK eset-trió mintáit új generációs, teljesexom-szekvenálás módszerével genotipizáltuk, Illumina HiScan (TMSQ) szekvenátor felhasználásával. A könyvtárkészítés NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 exome kit segítségével történt. A szekvenálás és polimorfizmusok meghatározásának minőségét térképezési minőségpont ($MQ>20$), variáns Phred-pont (site Phred score >20), és olvasási lefedettség (read-depth >4) alapján ellenőriztük. A minőségi szűrés és mendeli hibák eltávolítása után 120 719 biallélikus SNP-vagy indelvariáns állt rendelkezésre, ebből 66 737 mutatott additív transzmissziót minimálisan egy informatív családdal, közülük 29 800 allél transzmissziója volt legalább négy informatív családban vizsgálható.

Mind a GAIN-, mind az MGS GWAS-mintáinkat az Affymetrics Genome-Wide 6 csippel genotipizálták, amely 1 000 000 gyakori SNP-t hibridizál. Minőség-ellenőrzés során kiszűrésre kerültek a túl ritka (minor allélfrekvencia: $MAF<0,01$), a Hardy–Weinberg egyensúlyi eloszlástól túlzottan eltérő ($p_{H-W}<1*10^{-6}$), valamint a 2% genotípushiányt meghaladó variánsok. A szűrést követően 716 923 közös genotipizált SNP maradt mindkét GWAS-mintában, ezekből csak 9366 SNP volt megtalálható SCHIZOBANK teljesexom-mintán is. Az átfedés növelése érdekében a GWAS-mintát az IMPUTE2¹⁰ haplotípus-alapú algoritmusával imputáltuk, a 1000 Genomes¹¹ Phase1v3 kiadásának teljes populációját használva referenciagenomként. Az imputációs hibák csökkentése érdekében kizártuk a referenciagenom ritka markereit ($MAF<0,01$) és imputációt követően csak a legjobb minőségű, biallélikus variánsokat tartottuk meg (imputációs valószínűség $>0,9$, információmutató $>0,9$, $MAF>0,01$). A minőségkritériumoknak 7 942 021 SNP-vagy indelvariáns felelt meg, amellyel a minták közti lefedettség 22 279 markerre bővült. A két minta annotációját a KGGseq¹² szoftver segítségével végeztük az UCSC hg19 referenciagenom és a GENCODE v19 koordináták alapján.

STATISZTIKAI ELEMZÉS

Vizsgálatunk három, egymásra épülő elemzésre tagozódott.

1. A multilókuszesztekhez szükséges teljesgenom-variáns asszociációk kiszámítása mindkét tesztmintán az additív modell szerint, korrigálva a zavaró hatásokra.

2. A variáns asszociációk kombinációja alapján, teljes genom, gén- és génszettalapú asszociációk és feldúsulások elemzése az explorációs mintán, és a legalább szuggesztív asszociációt vagy feldúsulást mutató ($p<0,1$) gének és génszettek megvizsgálása a replikációs mintán.

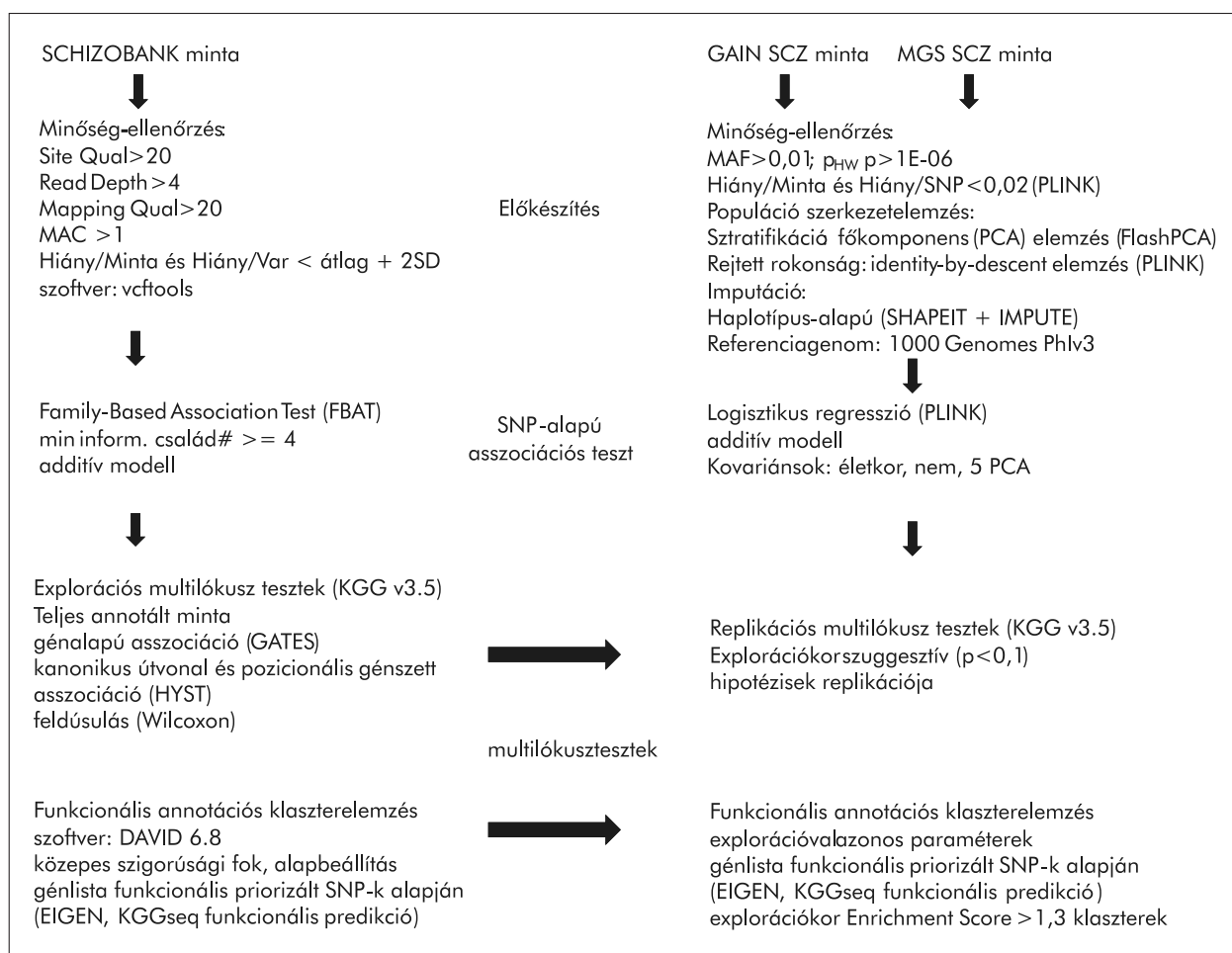
3. Predikciós algoritmusokkal funkcionálisnak jelzett variánsokat hordozó rizikogének meghatározása, és funkcionális annotációik klaszterezése és elemzése mindkét mintán (**1. ábra**). A többszörös összehasonlítás korrekcióját a replikációs lépésben végeztük, a különböző multilókuszmódszerek szerinti hipotéziscsoportoknak megfelelően, a csoportba tartozó explorációs és replikációs tesztek összesített száma szerinti Bonferroni-korrekcióval. A génalapú hipotéziscsoport 17 600, a génszett-asszociációk 1107, a génszettefeldúsulás 1107, a funkcionális annotációs klaszterelemzés pedig 927 tesztelt hipotézist tartalmazott.

Az SNP- és indelasszociációk elemzése

A variánsok asszociációs elemzését mindkét mintán additív öröklési modellt feltételezve végeztük. Az explorációs, eset-szülő trió alapú SCHIZOBANK-mintában, a minta alacsony elemszámára tekintettel, az inkomplett genotípusú triókat is használni képes, Family-Based Association Test¹³ (FBAT) elemzést végeztük el. Az alacsony elemszám miatt az FBAT-statisztika számításához szükséges informatív triók számát a javasolt 10-ről 4-re csökkenttük, a teszt érvényességét maximálisan 100 000 ciklusban végzett adaptív permutációval biztosítottuk. A replikációs minta megfelelő nagysága miatt logisztikus regressziós modelleket használtunk, amelyek kovariánsként a nem és az életkor mellett, a populációstratifikáció zavaró hatását korrigáló főkomponenseket is tartalmazták. A főkomponenselemzést a genotipizált, egymással nem kapcsolt ($r^2<0,2$) markerekre korlátozva, a FlashPCA¹⁴ program segítségével végeztük. A replikációs minta SNP-alapú asszociációit a PLINK¹⁵ program segítségével számítottuk.

Gén- és génszettalapú elemzés

A gén- és génszettalapú analíziseket a Knowledge-based mining system for Genome-wide Genetic studies (KGG)¹⁶ szoftver 3.5 verziójával végeztük, amely az SNP-k asszociációs statisztikái és kapcsoltsági mutatói alapján számítja a régióalapú



1. ábra. A vizsgálat módszertani összefoglalója

asszociációt és a feldúsulási összefüggéseket. A génalapú asszociációkat a KGG kiterjesztett Simes' tesztjével (GATES)¹⁷ elemeztük, amely a vizsgált gén legjobb SNP-asszociációja alapján határozza meg a régió asszociációját. A módszer előnye, hogy sok neutrális marker esetén sem veszít statisztikai erejéből, és kevésbé érzékeny a kapcsoltság hatására, vagy a markerek számára. A vizsgált gének határait a GENCODE v19 kiadásában rögzített koordinátákhoz képest mindkét irányban 5 kilobázis méretben kiterjesztve határoztuk meg.

A kanonikus útvonalakat és a pozicionális génszetteket az MSiGDB¹⁸ v5.2 c2.cp, illetve c1 adatbázis alapján végeztük, a kanonikus útvonalak ismert átfedései miatt a redundanciát a ReCiPa¹⁹ algoritmusával kontrolláltuk, 0,85 maximális, 0,1 minimális átfedés paraméterekkel. Az MSiGDB 1329 kanonikus útvonalából a ReCiPa algoritmus 541 nem átfedő kanonikus útvonalat, és 122 „superútvonalat” (Superpathway) definiált. Génszett-elemzés metodológiai ajánlásait követve, két külön-

böző statisztikai módszert alkalmaztunk: a KGG hybrid set-based test (HYST)²⁰ nevű, önálló (nem kompetitív), régióalapú asszociációt vizsgáló tesztjét, valamint a kompetitív jellegű, Wilcoxon előjeles rangszámösszeg feldúsulási elemzést. A HYST teszt az adott génszethez tartozó, de egymással nem kapcsolt régiók, χ^2 -statisztikáit összegezve határozza meg a génszett közös asszociációját. A Wilcoxon-teszt pedig a vizsgált génszett génjeihez tartozó GATES p-értékek eloszlását veti össze a génszeten kívüli gének p-értékeinek megoszlásával. Az útvonalak méretéből eredő torzítás minimalizálása érdekében az elemzést 10–500 gént tartalmazó útvonalakra korlátoztuk. A tesztekhez szükséges kapcsoltsági paramétereket az imputációhoz is használt, 1000 Genomes Phase1v3 kiadásának európai leszármazású (n=379) haplotípusaiból számítottuk. Az explorációs mintán szuggesztív asszociációt mutató (p < 0,1) gének és útvonalak asszociációt azonos paraméterek mellett vizsgáltuk a replikációs mintán.

A funkcionális annotációs klaszterek meghatározását az online elérhető Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) 6.8 verziójával^{5, 21} végeztük. Az információs források növelése érdekében az alapbeállítás annotációs forrásait kiegészítettük az ontológiai kategóriából „leggyakrabban használt terminológia” (GOTERM_FAT) adatokkal, az általános annotációs csoportból a kromoszóma, a citogenetikai sáv és a hivatalos gén szimbólum annotációival, az útvonalak kategóriából pedig a REACTOME útvonalai-val. A klaszterek meghatározásához használt felül-reprezentációs teszt bemeneti adatait mindkét mintában azonos algoritmus szerint kiválasztott rizikógének listái jelentették. Rizikógénként a KGGseq mendeli és regulátoros predikciós algoritmusát alapján, vagy az EIGEN²² spektrális algoritmusát alapján funkcionálisnak jelölt, illetve a KGGseq annotációja alapján splicing módosítást valószínűsítő, legalább szuggesztív asszociációval bíró (explorációs minta: $p < 0,1$, replikációs minta: $p < 0,05$) variánsokat hordozó géneket definiáltuk. Az explorációs SCHIZOBANK-mintában a kombinált predikciós algoritmussal 441, valószínűsített funkcionális variánst hordozó 402 rizikógént azonosítottunk, míg a replikációs GAIN-MGS mintában 3941 funkcionálisnak jósolt variánst és 1785 rizikógént határoztunk meg. Mind a rizikóvariánsok, mind a rizikógének tekintetében alacsony volt a minták közti átfedés (közös rizikóvariáns: 23, közös rizikógén: 75), az explorációs minta rizikóvariánsainak 5,21%-át és rizikógénjeinek 18,66%-át jelentette. A DAVID teszt háttéréként a mintákban a KGGseq által annotált GENCODE géneket vettük alapul, az explorációs minta esetében ez 14 618 gént jelentett, a replikációs minta 38 940 gént fedett le. A DAVID klaszterező algoritmusát az alapértelmezett (közepes) szigorúsági fokon használtuk. A klaszterek feldúsulási mutatója (enrichment score, ES) az annotációs terminusok p-értékei negatív logaritmusának mértani közepe. Ezért a klaszterek nominálisan szignifikáns küszöbértékét $ES = 1,3$ ($-\log_{10} 0,05$) pontban határoztuk meg, a kis elemszámú explorációs mintánkon az $ES > 1,2$ értékkel rendelkező klasztereket is megvizsgáltuk.

Eredmények

GÉNALAPÚ ASSZOCIÁCIÓK

Az explorációs teljesexom-mintán 29 821 variáns felelt meg a szűrési kritériumoknak, amelyek a

GENCODE alapján 15 795 gént és transzkriptet annotáltak, a replikációs mintán pedig 7 848 329 variáns 51 366 GENCODE gént és transzkriptet annotált. A variáns asszociációkat géalapú asszociációvá kombináló GATES teszt 1805 gén esetében eredményezett szuggesztív p-értéket ($p < 0,1$) az explorációs mintán, közülük 145 gén asszociálódott legalább nominálisan szignifikáns p-értékkel ($p < 0,05$) a replikációs mintán is. Mindazonáltal, a két minta 10 legalacsonyabb p-értékkel rendelkező génei között nem találtunk átfedést, és a géalapú tesztek teljes száma szerint ($n = 17\ 600$) végzett Bonferroni-korrekción után a legjobb p-érték sem maradt szignifikáns (PTPN21, $p_{\text{exp}} = 0,026$, $p_{\text{rep}} = 6,42 \cdot 10^{-6}$, $p_{\text{corr}} = 0,113$). A géalapú tesztek $P_{\text{rep_nom_g}} = 0,008$, nominális replikációs rátát és $P_{\text{rep_corr_g}} = 0$ többszörös összehasonlításra korrigált replikációt eredményeztek. A leginkább replikált géalapú asszociációk p-értékei a **2. táblázatban** láthatók.

GÉNSZETTELELMZÉSEK: KANONIKUS ÚTVONAL ÉS POZICIONÁLIS GÉNSZETT-TESTEK

Az explorációs mintán a 663 útvonalból 104 mutattott szuggesztív ($p < 0,1$) p-értéket a HYST régió-alapú asszociációs tesztje során, vagy a Wilcoxon rangszámösszeg feldúsulási teszt alapján. A 104 szuggesztív útvonalból hat útvonal esetében sikerült, az explorációs p-értékeknek megfelelően, a HYST asszociációs tesztet, vagy pedig a Wilcoxon feldúsulási tesztet legalább nominálisan szignifikáns p-értékkel replikálni a GAIN-MGS GWAS-mintán, azonban egyik asszociáció vagy feldúsulás sem maradt szignifikáns a többszörös összehasonlítás korrekciója után. A nominális szignifikanciával replikált kanonikus útvonalakat a **3. táblázat** mutatja be.

A pozicionális adatbázis 326 kromoszómaszegmenséből az explorációs mintán 248 felelt meg a méretbeli kritériumoknak, amelyek közül 91 szegmens HYST vagy Wilcoxon p-értéke bizonyult szuggesztív mértékben szignifikánsnak. A replikációs mintán nyolc szegmens asszociációjának vagy feldúsulásának nominálisan szignifikáns replikációját észleltük, ebből egy szegmens asszociációja és két szegmens feldúsulása a többszörös összehasonlítás korrekcióját követően is szignifikáns maradt (14q31: $p_{\text{exp_HYST}} = 0,098$, $p_{\text{rep_HYST}} = 1,5 \cdot 10^{-6}$, $p_{\text{rep_HYST_corr}} = 0,002$; 5q31: $p_{\text{exp_Wilcoxon}} = 7,2 \cdot 10^{-4}$, $p_{\text{rep_Wilcoxon}} = 5,6 \cdot 10^{-6}$, $p_{\text{rep_Wilcoxon_corr}} = 0,0062$; Xq13: $p_{\text{exp_Wilcoxon}} = 0,018$, $p_{\text{rep_Wilcoxon}} = 4,5 \cdot 10^{-5}$, $p_{\text{rep_Wilcoxon_corr}} = 0,048$). A génszett-tesztek összesített nominális replikációja $P_{\text{rep_nom_s}} = 0,072$, a többszörös összehasonlításra korrigált pedig $P_{\text{rep_corr:s}} = 0,015$. A

2. táblázat. Legjobb 10 replikációs p-értékkel bíró gén és transzkript régióalapú asszociációja az explorációs és a replikációs mintán

Gén (szimbólum)	Kromoszóma	Pozíció (bázispár)	Explorációs minta (n=16) p _{GATES} *	Replikációs minta (n=5337) p _{GATES} (korrigált)
Protein tirozin foszfatáz nonreceptor 21 (PTPN21)	14	88932121-89016966	0,0260	6,42*10 ⁻⁶ (0,113)
Kromoszóma strukturális fenntartó 1B (RP1-102D24.5)	22	45831743-45844624	0,0455	0,0002 (1,00)
Mátrix remodelling asszociált 5 (MXRA5)	X	3226605-3264682	0,0614	0,0005 (1,00)
C2H2 típusú cinkujj (ZFP42)	4	188916924-188926199	0,0325	0,0010 (1,00)
RIB43A coiled-coil domén 2	22	45809571-45828376	0,0455	0,0013 (1,00)
Feszültségfüggő Ca ²⁺ -csatorna a2d4 alegység (CACNA2D4)	12	1901122-2028002	0,0650	0,0015 (1,00)
BCL2 -asszociált athanogén 6 (BAG6)	6	31606804-31607565	0,0348	0,0017 (1,00)
Szinaptónémás komplex központi elem fehérje 2(SYCE2)	19	13009599-13030090	0,0707	0,0019 (1,00)
XK-asszociált 4 (XKR4)	8	56014948-56454613	0,0252	0,0022 (1,00)
MACC1 antiszenz RNS 1 (MACC1-AS1)	7	20181538-20193154	0,0143	0,0022 (1,00)

p_{GATES}: Kiterjesztett Simes'-teszt alapján számított régióalapú asszociációs p-érték

3. táblázat. Nominálisan replikált kanonikus útvonalak és átfedő útvonalakból összeállított „szuperútvonalak” mérete, asszociációs (HYST), illetve feldúsulási (Wilcoxon) p-értéket az explorációs és a replikációs mintán

Útvonal	Explorációs minta (n=16)		Replikációs minta (n=5337)	
	p _{HYST}	p _{Wilcoxon}	p _{HYST} (korrigált)	p _{Wilcoxon} (korrigált)
Superpathway 75	0,0086	0,0328	0,0039 (1,00)	0,5625 (1,00)
Superpathway 106	0,0304	0,0030	0,0047 (1,00)	0,7163 (1,00)
Superpathway 69	0,0329	0,2020	0,0071 (1,00)	0,4661 (1,00)
PID_HNF3B_PATHWAY	0,0875	0,0928	0,0149 (1,00)	0,5711 (1,00)
Superpathway 107	0,0292	0,0130	0,0166 (1,00)	0,5723 (1,00)
PID_P38_ALPHA_BETA_PATHWAY	0,0769	0,2305	0,0168 (1,00)	0,2107 (1,00)
				31

HYST:hybrid set-based association test, génsettelalapú asszociációs teszt

Wilcoxon: Wilcoxon rangösszeg feldúsulási teszt

Superpathway 69: REACTOME PD1 SIGNALING + REACTOME PHOSPHORYLATION OF CD3 AND TCR ZETA CHAINS

Superpathway 75: KEGG CELL CYCLE + BIOCARTE CELLCYCLE PATHWAY + BIOCARTE G1 PATHWAY

Superpathway 107: KEGG OXIDATIVE PHOSPHORYLATION + REACTOME RESPIRATORY ELECTRON TRANSPORT + REACTOME INSULIN RECEPTOR RECYCLING

Superpathway 106: REACTOME SIGNALING BY INSULIN RECEPTOR + REACTOME INSULIN RECEPTOR RECYCLING + REACTOME INSULIN RECEPTOR SIGNALING CASCADE + REACTOME ACTIVATION OF AMPK ACTIVITY VIA LKB1 + REACTOME SHC MEDIATED CASCADE + REACTOME ENERGY DEPENDENT REGULATION OF MTOR BY LKB1 AMPK + REACTOME REGULATION OF RHEB GTPASE ACTIVITY BY AMPK + REACTOME PKB MEDIATED EVENTS + REACTOME SIGNAL ATTENUATION + REACTOME SOS MEDIATED SIGNALING + REACTOME RAF MAP KINASE CASCADE + REACTOME SHC MEDIATED SIGNALING + REACTOME MTORC1 MEDIATED SIGNALING + REACTOME FGFR LIGAND BINDING AND ACTIVATION + REACTOME FGFR2C LIGAND BINDING AND ACTIVATION + REACTOME FGFR4 LIGAND BINDING AND ACTIVATION + REACTOME FRS2 MEDIATED CASCADE

4. táblázat. Nominálisan replikált pozicionális génszettek mérete, asszociáció (HYST), illetve feldúsulási (Wilcoxon) p-értékei az explorációs és a replikációs mintán

Kromoszómasáv	Explorációs minta		Gének száma	Replikációs minta (n=5337)		(n=16)
	P _{-HYST} (korrigált)	P _{-Wilcoxon} P _{-Wilcoxon}		P _{-HYST} (korrigált)		Gének száma
14q31	0,0977	0,0374	16	1,54*10 ⁻⁶ (0,002)	0,0436 (1,00)	32
1p22	0,0320	0,0013	50	0,0112 (1,00)	0,1827 (1,00)	81
Xq13	0,0736	0,0181	12	0,0171 (1,00)	4,32*10 ⁻⁵ (0,048)	78
5q31	0,4765	7,20*10 ⁻⁴	134	0,0302 (1,00)	5,75*10 ⁻⁶ (0,006)	194
10q23	0,0123	2,87*10 ⁻⁶	55	0,0443 (1,00)	0,4366 (1,00)	91
5q12	0,0751	0,0150	29	0,0453 (1,00)	0,2533 (1,00)	43

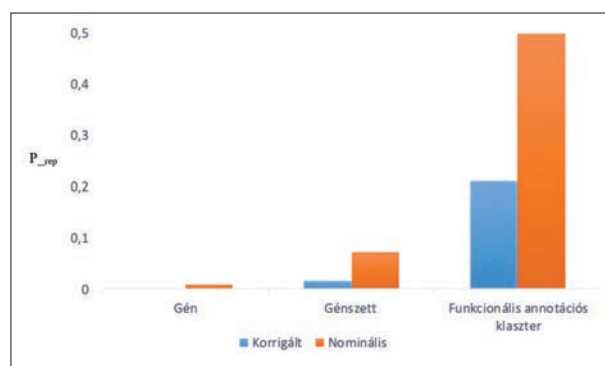
HYST: hybrid set-based association test, génszettelapú asszociációs teszt

Wilcoxon: Wilcoxon rangösszeg feldúsulási teszt

nominálisan szignifikáns replikált pozicionális génszetteket a **4. táblázat** tartalmazza.

FUNKCIONÁLIS ANNOTÁCIÓS KLASZTERELEMZÉS

Az explorációs minta 402 rizikógénjéből 386, míg a háttérként meghatározott 14 618 gén közül 13 647 rendelkezett DAVID-azonosítóval, a replikációs mintában pedig az 1785 rizikógénből 1543, a háttér génekből pedig 24 517 szerepelt az adatbázisban. Az explorációs minta 306 klaszteréből 12 annotációs klaszter bírt az ES>1,3 küszöb feletti feldúsulási mutatóval, további két annotációs klaszter volt jellemezhető közvetlenül küszöbérték alatti, de még szuggesztívnek tekinthető feldúsulási ponttal (ES>1,2). Azonos annotációs források és szigorúsági kritérium mellett, a replikációs minta rizikógénjeivel a lehetséges 621 klaszterből 126 annotációs klasztert azonosítottunk ES>1,3 feldúsulással, amelyek közül hét megegyezett az explorációs mintán ES>1,2 küszöbértékkel azonosított klaszterekkel. Legnagyobb feldúsulási mutatóval mindkét mintában a splicing (pre-mRNS nem átíródo részeinek kivágódása és érett mRNS-sé alakulása) és alternatív splicing annotációs terminusok klasztere bírt (ES_{exp}: 2,85, ES_{rep}: 23,93). Továbbá, az explorációs mintától eltérő rangsorban, de a replikációs mintában is feldúsultak az endoszómális transzport (ES_{exp}: 1,56, ES_{rep}: 1,90), a neuro- és axongenezis (ES_{exp}: 1,44, ES_{rep}: 2,25), az izom- és vázrendszer fejlődése (ES_{exp}: 1,40, ES_{rep}: 1,95), az embrionális fejlődés (ES_{exp}: 1,34, ES_{rep}: 4,77), a motoros viselkedés (ES_{exp}: 1,33, ES_{rep}: 2,30) és az agyfejlődés (ES_{exp}: 1,23, ES_{rep}: 4,55) funkcionális annotációs terminusaival kapcsolatos klaszterei. Mivel a szuggesztív klaszterek szelektíven nem vizsgálhatók, a klaszteranalízis replikációját a klaszterek összesített számára korrigáltuk ($\alpha=0,05/927$), ennek megfelelően az ES>4,27 feldúsulású klaszterek, azaz a splicing, az agyfejlődés és embrionális fejlődés



2. ábra. Nominális és többszörös összehasonlításra korrigált replikációs valószínűség (P_{-rep}) a növekvő összetettségű multilókus-elemzésekben

klaszttere, korrekció után is szignifikáns maradt. A funkcionális annotációs klaszterezés tehát P_{rep_nom_ac}=0,5 nominális, illetve P_{rep_corr_ac}=0,21 többszörös összehasonlításra korrigált replikációs rátát mutatott (**2. ábra**). A replikált klaszterek annotációs terminusaihoz kapcsolódó p_{EASE} és FDR-értékek részletesen az **5. táblázatban** szerepelnek.

Megbeszélés

Jelen vizsgálatunkban a szkizofrénia multilókus-markereinek régióalapú asszociációját, génszettelapú feldúsulását, valamint a feldúsult funkcionális annotációk klasztereit elemeztük. A SCHIZO-BANK eset-szülő trió mintán exploratív elemzéssel azonosított gének és kanonikus útvonalak közül számos asszociációt, valamint feldúsulást megismételtünk, replikáltunk nominális p-értékkel a GAIN-MGS GWAS mintán, azonban a többszörös összehasonlítás korrekcióját követően ezek egyike sem maradt szignifikáns, korrekció után a a legalacsonyabb korrigált p-értékkel (p=0,113) a Protein

tirozin foszfatáz nonreceptor 21 (PTPN21) gén rendelkezett. A pozicionális génszettek elemzésekor, az explorációs mintán a 10q23 kromoszómasáv feldúsulása, a replikációs mintán pedig a PTPN21 gént is tartalmazó, 14q31 szegmens régióalapú asszociációja, valamint az 5q31 és az Xq13 kromoszómaszegmensek feldúsulási tesztje esetében észleltünk – többszörös összehasonlításra korrigáltan is – szignifikáns p-értéket. A két mintán azonos paraméterű predikciós algoritmusokkal priorizált génlisták funkcionális annotációs klaszterelemzése, mindkét mintán a szkizofrénia feltételezett neurobiológiai hátterére utalhat, az elemzés a sejtosztódás és transzkripció szabályozásával, neuron- és axonfejlődéssel, agy- és embrionális fejlődéssel, illetve szinaptikus plaszticitással kapcsolatos annotációs klaszterek feldúsulását mutatta. Az explorációs mintán azonosított, 14 annotációs klaszter fele a replikációs mintán is nominális feldúsulást mutatott, közülük három, a szkizofrénia etiológiájához jól illeszkedő splicing/alternatív splicing, az agyfejlődés és az embrionális fejlődés klasztere, statisztikailag szignifikáns maradt a teljes hipotéziscsoportnak megfelelő p-érték-korrektció után is. A vizsgált multilókusz-„markerek” komplexitásának növekedésével mind a nominális, mind a korrigált replikációs valószínűség növekedését észleltük, amely megerősítette a multilókusz-asszociációs módszerek genetikai heterogenitást ellensúlyozó hatását.

Az explorációs lépcsőben szuggesztív p-értékkel bíró gének közül a 14q31 lokalizációjú PTPN21 asszociálódott a szkizofréniához a legalacsonyabb p-értékkel ($p_{\text{rep}}=6,42 \cdot 10^{-6}$) a replikációs mintában. Bár géalapú tesztek hipotéziscsoportjára korrigált p-értéke csak szuggesztív övezetbe sorolható ($p_{\text{rep,corr}}=0,113$), az asszociáció érvényessége mellett szól, hogy a gént tartalmazó 14q31 pozicionális génszett asszociációja a korrekció után is szignifikáns maradt ($p_{\text{rep,HYST}}=1,5 \cdot 10^{-6}$, $p_{\text{rep,HYST,corr}}=0,002$). A PTPN21 és a szkizofrénia kapcsolatát korábbi kutatások is felvetették. *Chen* és munkatársai²³ a szkizofrénia és a PTPN21 és a közeli EML5 gének, potenciálisan funkcionális nukleotid polimorfizmusok szignifikáns asszociációját közölték. Jóllehet az explorációs mintájuk részben átfed jelen vizsgálat replikációs mintáival, a PTPN21 SNP asszociációit metaanalízissel összevont, 13 független mintán is sikeresen demonstrálták. Bár a PTPN21 gén funkciója még nem teljesen tisztázott, a PTPN gének által kódolt protein tirozin foszfatázok a T-sejtes immunválasz, valamint sejtnövekedés fontos szabályozó faktorai. *Plani-Lam* és munkatársai²⁴ szerint a PTPN21 meghatározó a neuregulin3 (NRG3) neurotróf faktor aktiválásában.

Az MSiG v5.2 adatbázis független kanonikus

5. táblázat. Statisztikailag szignifikánsan replikált, funkcionális annotációs klaszterek feldúsulási pontjai (ES) és terminusaik feldúsulási p_{EASE} értékei az explorációs és replikációs minta priorizált génjei szerint

Klaszter / terminus	Explorációs minta ES p_{EASE}	Explorációs minta ($n_{\text{gen}}=386$) FDR	Gének száma (%)	Replikációs minta ES p_{EASE}	Replikációs minta ($n_{\text{gen}}=1543$) FDR	Gének száma (%)
1. klaszter	ES: 2,85			ES: 23,93		
splice variant	$2,43 \cdot 10^{-4}$	0,0041	200 (51,81%)	$2,57 \cdot 10^{-26}$	$4,80 \cdot 10^{-25}$	783 (50,75%)
alternative products	0,0016	0,0132	192 (49,74%)	$1,53 \cdot 10^{-25}$	$2,20 \cdot 10^{-24}$	1006 (65,20%)
alternative splicing	0,0071	0,0926	248 (64,25%)	$4,10 \cdot 10^{-22}$	$3,29 \cdot 10^{-21}$	755 (48,93%)
2. klaszter	ES: 1,34			ES: 4,77		
GO:0009790: embryo development	0,0068	0,1209	34 (8,81%)	$1,34 \cdot 10^{-8}$	$2,67 \cdot 10^{-7}$	131 (8,49%)
GO:0048598: embryonic morphogenesis	0,0532	0,6445	20 (5,18%)	$2,91 \cdot 10^{-5}$	$5,80 \cdot 10^{-4}$	77 (4,99%)
GO:0048568: embryonic organ development	0,0875	0,8230	15 (3,89%)	0,0084	0,1550	51 (3,31%)
3.klaszter	ES: 1,24			ES: 4,55		
GO:0007417:central nervous system development	0,0492	0,6147	29 (7,51%)	$2,33 \cdot 10^{-9}$	$4,64 \cdot 10^{-8}$	132 (8,55%)
GO:0007420:brain development	0,0630	0,7080	23 (5,96%)	$6,05 \cdot 10^{-7}$	$1,21 \cdot 10^{-5}$	99 (6,41%)
GO:0060322: head development	0,0631	0,7085	24 (6,22%)	$9,19 \cdot 10^{-8}$	$1,83 \cdot 10^{-6}$	106 (6,87%)
GO:0030900:forebrain development	0,0828	0,8048	14 (3,63%)	$1,09 \cdot 10^{-6}$	$2,18 \cdot 10^{-5}$	61 (3,95%)

ES: enrichment score, a klaszter terminusainak medián feldúsultsági mutatója, $ES=-\log_{10}(p_{\text{EASE}})$

p_{EASE} : terminus felülreprezentációját mutató, módosított Fisher p-érték

FDR: false discovery rate, Benjamini-Hochberg szerint

útvonalai és az átfedőkből összeállított „szuperútvonalak” sem az explorációs lépésben, sem replikáció során nem értek el többszörös összehasonlításra korrigált, statisztikailag szignifikáns asszociációt vagy feldúsulást, hasonlóan a Psychiatric Genomics Consortium útvonalelemzéséhez⁶. Hat útvonal esetében találtunk nominálisan szignifikáns replikációt, amelyek a szkizofrénia sejtosztódással, apoptózissal, neurondifferenciálódással, stresszre adott válasszal és gyulladásal való kapcsolatára utalnak, amely illeszkedik a szakirodalmi adatokhoz^{25, 26}. Mindazonáltal, a többszörös összehasonlítás korrekciója után egyik kanonikus útvonal asszociációja sem maradt szignifikáns, ezért a plauzibilisnek tűnő asszociációk esetében is további vizsgálatok szükségesek.

A kromoszómaszegmensek által definiált pozicionális génszettek esetében viszont a 14q31 szegmens asszociációját, valamint a 5q31 és Xq13 szegmensek feldúsulását korrekció után is szignifikáns p-értékkel replikáltuk. A 14q31 szegmensben, a korábban tárgyalt PTPN21 gén mellett, az EML5, ZC3H14, SPATA7, TTC8 és SEL1L gének esetében mértünk nominálisan szignifikáns replikációt. Az SZGR2 adatbázis²⁷ szerint, az SEL1L gén kivételével, mindegyik gén esetében közöltek korábban szkizofréniával asszociálódó gyakori variánsokat, emellett a ZC3H14 és a SPATA7 gének metilációs mintázatukban, a TTC8 gén pedig expressziójában mutatott eltérést szkizofréniámintákban. Ez utóbbi eredmények az epigenetikai szabályozás lehetséges eltéréseire mutatnak rá szkizofréniában. Funkcióik alapján, a TTC8, EML5 és a SPATA7 a cytoskeleton megfelelő működésének fenntartásával, a TTC8 az axonogenezis, a ZC3H14 pedig mRNS-stabilizáló hatásával szükségesek az idegrendszer fejlődéséhez. A régióban található, szkizofréniában korábban implikált, STON2 és NRXN3 gének asszociációja egyik mintában sem érte el a $p < 0,1$ küszöböt.

A 5q31 és Xq13 kromoszómarégiók esetében a feldúsulást mérő Wilcoxon p-értékük maradt a korrekció után is szignifikáns. A feldúsulási próbával a génszetten belüli és kívüli gének p-értékeinek eloszlását hasonlítjuk össze, a tesztstatisztika értékében nemcsak a legerősebb vagy bizonyos küszöbértéket meghaladó asszociációk, hanem az összes asszociáció trendszerű eltérése is meghatározó lehet. Ezért az asszociációs próbával szemben, a legjobb gének kiemelt tárgyalása helyett, a teljes génszett korrelációját vizsgáltuk az MSiGDB v5.2 génontológiai (GO) annotációival. Az 5q31 szegmens génjei a sejtadhézió, szinapszisszerveződés, szinaptikus jelátadás, kalciumkötés és kalciumfüggő sejtadhézió GO terminusaival korreláltak

FDR $<0,05$ korrekció mellett, összhangban a PGC szkizofrénia megaanalízis eredményeivel³. Az Xq13 sáv génszettje pedig az RNS-polimeráz II transzkripció regulációja és acetyl-transzferáz funkció terminusaival korrelált.

A funkcionális annotációk elemzése előtt, a KGGseq program gépi tanuláson és mélytanuláson alapuló predikcióit és az EIGEN adatbázis annotációját kombinálva, a funkcionálisnak jósolt kódoló (mendeli predikció²⁸) vagy nem kódoló (regulátoros predikció²⁹) variánsok alapján prioritizáltuk a minták genomjait. A prioritizált génlistákhoz kapcsolódó, funkcionális annotációk klaszterelemzésekor, az explorációs minta nominális feldúsulást mutató klaszterei közül, három esetében regisztráltunk többszörös összehasonlítás korrekciójának is megfelelő feldúsulási pontot: a splicing/alternatív splicing, az embrionális fejlődés és az ideg/agyfejlődés annotációs klaszternél. Mindhárom klaszter feldúsulása illeszkedik a szkizofrénia neuronális fejlődéssel kapcsolatos betegségmodelljébe. A splicing/alternatív splicing a transzkripció kromatinstátusztól független, szabályozó mechanizmusa, melynek segítségével sejtípus-specifikus mRNS-transzkriptvariánsok jöhetnek létre. Ez a szabályozási lépés a neuronális fejlődés mellett a gyulladásos citokinek termelődését is befolyásolja, tehát a szkizofrénia neuroinflammációs etiológiáját is erősítheti. Ugyanakkor, nem zárhatjuk ki, hogy a magas ES-pont ellenére a klaszter csak műtermék, a prioritizációs algoritmusok a regulátoros helyek felismeréséhez a splicing helyek gépi tanuláson alapuló annotációját is tartalmazták, ami vezethetett a splicing/alternatív splicing feldúsulásához. Végezetül megemlítendő, hogy a szkizofrénia etiológiájában jelen ismereteink szerint központi szerepet játszó neurotransmisszió, szinaptikus funkciók és plasticitás zavarára utaló klaszterek csak az explorációs mintából hiányoztak, a replikációs minta 126 nominális klasztere között jelen voltak, amely főként a két minta közötti metodológiai és méretbeli különbségeknek tudható be.

Vizsgálatunk másik fő célja a multilókuszelemzések replikációs valószínűségekre gyakorolt hatásának felmérése volt, amelyhez mind a nominális, mind a többszörös összehasonlításra korrigált replikációk arányát regisztráltuk. A p-értékek korrekciójától függetlenül, a multilókuszelemzések egyértelműen növelik a replikáció valószínűségét a definiált „marker” komplexitásának megfelelően. A replikáció aránya valószínűleg a genetikai heterogenitás csökkenése miatt növekszik, de nem vethetjük el a lehetőségét, hogy e multilókuszmerek egyszerűen csak több gént annotálnak méretüknél fogva.

Vizsgálatunk nem mentes a korlátoktól sem. A SCHIZOBANK túlságosan kis elemszámú, és alacsony lefedettségű mintája explorációs célokra sem ideális. A statisztikai erő növelése érdekében az exploráció során szuggesztív p-értékű ($\alpha=0,1$) asszociációkat is elfogadtunk, a fals pozitív asszociációk ellensúlyozására a második lépcsőben konzervatív p-érték-korrekciónak végeztünk. A közös variánsok gyarapítása érdekében a 1000 Genomes ph1v3 mintája szerint imputáltuk az GWAS-mintát. Az imputáció az átfedést javította, azonban részben torzítja is az adatot: a hosszabb gének esetében több marker akad fenn a minőségkontroll-szűrőn, ezért a rövidebb gének viszonylagos lefedettségét megnöveli. A rövidebb gének feldúsulása torzíthatja a kompetitív génszett-tesztet, például a Wilcoxon-tesztet és a felülreprezentációs tesztet. E torzítást mérséklendő, a génszettek vizsgálatakor a kompetitív feldúsulási tesztek mellett régióalapú, HYST génszett-asszociációs tesztet is végeztünk.

Milyen gyakorlati, a klinikai munkában is hasznosítható következtetéseket fogalmazhatunk meg az eredmények alapján? A fenti összefüggések arra utalnak, hogy a szkizofrénia genetikai „architektúrájában”, felépítésében fontosak azok a gyakori, kis hatású variánsok, melyek biológiailag plauzibilis, de nem teljes mértékben átlátott és megértett agyfejlődési és immunológiai folyamatokra hatnak. Ezeket a variánsokat szüleik átadják gyerekeiknek, emiatt lesz a szkizofrén beteg elsőfokú rokonai, gyermekei között magasabb a betegség előfordulása. Fontos ugyanakkor hangsúlyozni, hogy a gyakori variánsok csak a vulnerabilitás kialakulásáért felelősek, a betegség manifesztálódásában rendkívül fontosak a környezeti rizikófaktorok, melyeknek egy része megelőzhető. Hasonlóan fontos klinikai tudás, hogy a bipoláris affektív zavar és a szki-

zofrénia gyakori variánsai átfedést mutatnak, tehát működik egyfajta „keresztöröklődés” a két betegség között. Szintén van átfedés a szkizofrénia és az autizmus genetikai hátterében, ugyanakkor ezt a ritka genetikai variánsok okozzák, melyeket ebben az elemzésben nem vizsgáltunk³⁰.

Összefoglalva vizsgálatunk eredményeit, a biológiai és molekuláris funkciók, jellemzők alapján definiált, multilókus genetikai elemzések a szkizofrénia etiológiájában implikált szinaptikus plaszticitás, neuron-, axon- és agyfejlődés, valamint immunológiai és transzkripciószabályozó annotációknak megfelelő gének, génszettek asszociációját, illetve feldúsulását eredményezték. Emellett a replikáció valószínűségét – komplexitásukkal arányosan – egyértelműen elősegítették.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondunk a magyar SCHIZOBANK Konzorcium tagjainak és a betegbevonásban, valamint a korábbi elemzésekben részt vett munkatársainak: Álmos Péternek, Balicza Péternek, Bálint L. Bálintnak, Balogh Nórának, Barta Endrének, Benkovits Juditnak, Bitter Istvánnak, Égerházy Anikónak, Hársfalvi Viviennek, Horváth Attilának, Inczédy-Farkas Gabriellának, Janka Zoltánnak, Kassai-Farkas Ákosnak, Likó Istvánnak, Magyarósi Szilviának, Makkos Zoltánnak, Nagy Krisztiánnak, Nagy Tibornak, Németh Györgynek, Scholtz Beátának, Török Zsoltnak, Tűzkő Juditnak, Urbán Zoltánnak és Zahuczky Gábornak. Köszönet illeti a kutatásban részt vevő betegeket és családtagjaikat, valamint a mintagyűjtésben részt vevő szakápolókat is. Kutatásunkat az Országos Tudományos Kutatási Alap és a Nemzeti Agykutatási Program támogatták (OTKA-PD 83876 és NAP-B KTIA_NAP_13-2014-0011 dr. Réthelyi János számára).

IRODALOM

1. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a Complex Trait. Arch Gen Psychiatry 2003;60:1187. <http://dx.doi.org/doi:10.1001/archpsyc.60.12.1187>
2. Wray NR, Lee SH, Mehta D, Vinkhuyzen AAE, Dudbridge F, Middeldorp CM. Research review: Polygenic methods and their application to psychiatric traits. J Child Psychol Psychiatry 2014;55:1068-87. <http://dx.doi.org/doi:10.1111/jcpp.12295>
3. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. Nature 2014;511:421-7. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/nature13595>
4. Mooney MA, Nigg JT, McWeeney SK, Wilmot B. Functional and genomic context in pathway analysis of GWAS data. Trends Genet 2014;30:390-400. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tig.2014.07.004>
5. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res 2009;37:1-13. <http://dx.doi.org/doi:10.1093/nar/gkn923>
6. Sullivan PF, Posthuma D. Biological pathways and networks implicated in psychiatric disorders. Curr Opin Behav Sci 2015;2:58-68. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.cobeha.2014.09.003>
7. Inczédy-Farkas G, Benkovits J, Balogh N, Álmos P, Scholtz B, et al. SCHIZOBANK – The Hungarian national schizophrenia biobank and its role in schizophrenia research. Orv Hetil 2010;151:1403-8. <http://dx.doi.org/doi:10.1556/OH.2010.28943>
8. Manolio TA, Rodriguez LL, Brooks L, Abecasis G, Ballinger D, Daly M, et al. New models of collaboration in

- genome-wide association studies: the Genetic Association Information Network. *Nat Genet* 2007;39:1045-51. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/ng2127>
9. Suarez BK, Duan J, Sanders AR, Hinrichs AL, Jin CH, Hou C, et al. Genomewide linkage scan of 409 European-ancestry and African American families with schizophrenia: suggestive evidence of linkage at 8p23.3-p21.2 and 11p13.1-q14.1 in the combined sample. *Am J Hum Genet* 2006;78:315-33. <http://dx.doi.org/doi:10.1086/500272>
 10. Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. Schork NJ, editor. *PLoS Genet* 2009;5(6):e1000529. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000529>
 11. McVean GA, Altshuler (Co-Chair) DM, Durbin (Co-Chair) RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; 491(7422):56-65. <https://doi.org/10.1038/nature11632>
 12. Li M-X, Gui H-S, Kwan JSH, Bao S-Y, Sham PC. A comprehensive framework for prioritizing variants in exome sequencing studies of Mendelian diseases. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e53. <http://dx.doi.org/doi:10.1093/nar/gkr1257>
 13. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol* 2000;19(Suppl 1):S36-42. [http://dx.doi.org/doi:10.1002/1098-2272\(2000\)19:1+::AID-GEPI6>3.0.CO;2-M](http://dx.doi.org/doi:10.1002/1098-2272(2000)19:1+::AID-GEPI6>3.0.CO;2-M)
 14. Abraham G, Inouye M, Zhang Y. Fast principal component analysis of large-scale genome-wide data. *PLoS One* 2014;9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093766>
 15. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-75. <http://dx.doi.org/doi:10.1086/519795>
 16. Li M-X, Sham PC, Cherny SS, Song Y-Q. A knowledge-based weighting framework to boost the power of genome-wide association studies. *PLoS One* 2010;5:e14480. <http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0014480>
 17. Li M-X, Gui H-S, Kwan JSH, Sham PC. GATES: A Rapid and Powerful Gene-Based Association Test Using Extended Simes Procedure. *Am J Hum Genet* 2011;88:283-93. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ajhg.2011.01.019>
 18. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15545-50. <http://dx.doi.org/doi:10.1073/pnas.0506580102>
 19. Vivar JC, Pemu P, McPherson R, Ghosh S. Redundancy control in pathway databases (ReCiPa): an application for improving gene-set enrichment analysis in Omics studies and “Big data” biology. *OMICS* 2013;17:414-22. <http://dx.doi.org/doi:10.1089/omi.2012.0083>
 20. Li MX, Kwan JSH, Sham PC. HYST: A hybrid set-based test for genome-wide association studies, with application to protein-protein interaction-based association analysis. *Am J Hum Genet* 2012;91:478-88. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.004>
 21. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44-57. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/nprot.2008.211>
 22. Ionita-Laza I, McCallum K, Xu B, Buxbaum JD. A spectral approach integrating functional genomic annotations for coding and noncoding variants. *Nat Genet* 2016;48:214-20. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/ng.3477>
 23. Chen J, Lee G, Fanous AH, Zhao Z, Jia P, O'Neill A, et al. International Schizophrenia Consortium, Two non-synonymous markers in PTPN21, identified by genome-wide association study data-mining and replication, are associated with schizophrenia. *Schizophr Res* 2011;131:43-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2011.06.023>
 24. Plani-Lam JH-C, Chow T-C, Siu K-L, Chau WH, Ng M-HJ, Baoet S, et al. PTPN21 exerts pro-neuronal survival and neuritic elongation via ErbB4/NRG3 signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;61:53-62. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.biocel.2015.02.003>
 25. Hess JL, Tylee DS, Barve R, de Jong S, Ophoff RA, Kumasasinghe N, et al. Transcriptome-wide mega-analyses reveal joint dysregulation of immunologic genes and transcription regulators in brain and blood in schizophrenia. *Schizophr Res* 2016;176:114-24. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.schres.2016.07.006>
 26. Darby MM, Yolken RH, Sabuncyan S. Consistently altered expression of gene sets in postmortem brains of individuals with major psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 2016; 6:e890. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/tp.2016.173>
 27. Jia P, Han G, Zhao J, Lu P, Zhao Z. SZGR 2.0: a one-stop shop of schizophrenia candidate genes. *Nucleic Acids Res* 2016;gkw902. <http://dx.doi.org/doi:10.1093/nar/gkw902>
 28. Li M-X, Kwan JSH, Bao S-Y, Yang W, Ho S-L, Song Y-Q, et al. Predicting mendelian disease-causing non-synonymous single nucleotide variants in exome sequencing studies. *PLoS Genet* 2013;9:e1003143. <http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pgen.1003143>
 29. Li MJ, Pan Z, Liu Z, Wu J, Wang P, Zhu Y, et al. Predicting regulatory variants with composite statistic. *Bioinformatics* 2016;32:2729-36. <http://dx.doi.org/doi:10.1093/bioinformatics/btw288>
 30. Réthelyi JM, Benkovits J, Bitter I. Genes and environments in schizophrenia: The different pieces of a manifold puzzle. *Neurosci Biobehav Rev* 2013;37:2424-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.010>

ELECTROPHYSIOLOGICAL ALTERATIONS AND GENERAL TOXIC SIGNS OBTAINED BY SUBACUTE ADMINISTRATION OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES TO THE AIRWAYS OF RATS

Tamara HORVÁTH¹, András PAPP¹, Dávid KOVÁCS², Ildikó KÁLOMISTA³, Gábor KOZMA⁴, Tünde VEZÉR¹

¹Department of Public Health, University of Szeged Faculty of Medicine, Szeged

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Szeged Faculty of Science and Informatics, Szeged

³Department of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Szeged Faculty of Science and Informatics, Szeged

⁴Department of Applied and Environmental Chemistry, University of Szeged Faculty of Science and Informatics, Szeged



English | <http://dx.doi.org/10.18071/isz.70.0127> | www.elitmed.hu

TITÁN-DIOXID NANORÉSZECSKÉK SZUBAKUT LÉGÚTI ADAGOLÁSÁVAL KIVÁLTOTT ELEKTROFIZIOLÓGIAI ELTÉRÉSEK ÉS ÁLTALÁNOS TOXICITÁS PATKÁNYBAN

Horváth T, MD; Papp A, MD; Kovács D, MD; Kálomista I, MD; Kozma G MD; Vezér T, MD

Ideggyogy Sz 2017;70(3–4):127–135.

Introduction and aims – Particles of titanium dioxide (TiO₂) with typical size below 100 nm have gained a broad range of application by now, partly involving direct human exposure. Their known properties – high specific surface, mobility within the organism, induction of oxidative stress, release of inflammation mediators etc. – raise the possibility of nervous system damage but the available data regarding this are scarce and contradictory. Based on that, and the experiences with other metal oxide nanoparticles, the aim of the present study was to investigate certain general end nervous system toxic effects of TiO₂ nanoparticles applied in the airways of rats.

Materials and methods – Young adult Wistar rats (5 groups of 10 rats each) received, daily for 28 days, intratracheal instillations of titanium dioxide nanoparticles of ca. 10 nm diameter, suspended in 1% hydroxyethyl cellulose dissolved in phosphate-buffered saline, in the doses of 1, 3, and 10 mg/kg b. w. Vehicle controls received the suspension medium and there was also an untreated control group. During treatment, the rats' body weight was measured, and their clinical state observed, daily. After the 28 days, spontaneous cortical activity, sensory evoked potentials and tail nerve action potential was recorded in urethane anesthesia, then the rats were dissected and tissue samples were taken for Ti level determination and biochemical measurements of some oxidative stress indicators.

Bevezetés és célkitűzés – A titán-dioxid (TiO₂) nanoméretű, jellemzően 100 nm-nél kisebb, részecskéi ma már számos, részben közvetlen emberi expozícióval járó alkalmazásban megjelentek. Ismert tulajdonságaik – nagy fajlagos felület, szervezetben belüli mozgékonyág, oxidatív stressz keltése, gyulladásmediátorok felszabadítása stb. – alapján idegrendszeri károsodást okozhatnak, azonban erre vonatkozóan csak kevés és ellentmondó adat áll rendelkezésre. Erre, és más fénoxid-nanorészecskékkel szerzett tapasztalatokra alapozva a jelen munkában azt vizsgáltuk, milyen általános és idegrendszeri toxikus hatás idézhető elő TiO₂-nanorészecskék patkányok légutiba való adagolásával.

Anyagok és módszerek – Fiatal felnőtt hím Wistar-patkányokat (öt csoport, 10-10 állat) kezeltünk naponta, 28 napig, 1% hidroxietil-cellulózt tartalmazó foszfátpufferelt fiziológias oldatban szuszpendált, körülbelül 10 nm átmérőjű TiO₂-nanorészecskék intratrachealis instillációjával, 1, 3 és 10 mg/ttkg dózisban. A vivőanyagok kontrollcsoport a szuszpendáló közeget kapta instillálva, míg a kezeletlen kontrollok semmit sem. A kezelés során naponta mértük a testtömeget és megfigyeltük az állatok általános klinikai állapotát. Az expozíciós periódust követően uretánnalaltásban kéri alapaktivitást, szenzoros kiváltott potenciálokat, és a farokideg akciós potenciálját regisztráltuk; végül az állatokat felboncoltuk és szövetmintákat vettünk fémszint-meg-

Correspondent: András PAPP MD, Department of Public Health, University of Szeged Faculty of Medicine; 6720 Szeged, Dóm tér 10. Phone: +36-62-545-119, Fax: +36-62-545-120, E-mail: papp.andras@med.u-szeged.hu <http://orcid.org/0000-0003-0485-0806>

Érkezett: 2016. november 2. Elfogadva: 2017. január 5.

Results – The two higher doses reduced the rate of body weight gain significantly. Sensory evoked potentials and tail nerve action potential were significantly slowed, but the change in the spectrum of spontaneous cortical activity was not significant. Correlation of moderate strength was found between certain evoked potential parameters and brain Ti level and oxidative stress data.

Conclusion – Our results underlined the possible neurotoxicity of TiO₂ NPs but also the need for further investigations.

Keywords: nanoparticles, titanium dioxide, neurotoxicity, oxidative stress

Nano-titanium, more exactly particles of TiO₂ with typical size below 100 nm, has gained by now a broad range of application, first of all as white pigment; in paints and coatings but also in food, personal care and pharmaceutical products¹, possibly leading to direct exposure of humans. Primary production (yearly a few thousand tons worldwide) and processing to final products involves the risk of workplace exposure by inhalation²; the actuality of the health risk is indicated by the occupational exposure limit of 0.3 mg/m³ for ultrafine (<100nm diameter) TiO₂, set by National Institute of Occupational safety and Health³.

On inhalation (the most typical way of exposure) nanoparticles (NPs) are either deposited in the nasopharynx or get down to the alveoli; then reach distant body parts by migrating along the olfactory and other nerves, or by crossing the alveolar and capillary wall and entering systemic circulation. The high surface-to-volume ratio of NPs results in intense surface-dependent reactions, among others generation of reactive oxygen species. NPs were shown also to target mitochondria directly and disrupt oxidative phosphorylation, also resulting in ROS⁴.

Oxidative stress of any source can especially affect the nervous system because of its high sensitivity, due to highly active mitochondrial energy production to cover the neurons' energy demand, to abundance of (unsaturated) structural lipids, and to low antioxidant defence capacity⁵. The nervous system consequences seen in animals treated experimentally with TiO₂ NPs have been up to now rather variable. In some experiments, access of TiO₂ NPs to the rat brain after application to the airways was verified, together with damage to the blood-brain

barrier⁶; the same authors also reported dose- and time-dependent toxicity of the identical TiO₂ NPs on rat astrocytes *in vitro*. Others, however, found that most of the nano-TiO₂ remained in the lungs⁷.

Functional alterations, possibly resulting from access of TiO₂ NPs to the brain, have been described at the level of electrophysiological changes only a few times up to now. Using murine frontal cortex neuronal networks cultured *in vitro*, uptake of nano-TiO₂ by the cells and massive depression of spike activity was found⁸. In mice, 60 days oral nano-TiO₂ treatment caused neuronal degeneration and dose-dependently reduced hippocampal long-term potentiation *in vivo*⁹.

Human cultured neuronal (SH-SY5Y) and glial (D384) cells also showed TiO₂ NP internalization, followed by mitochondrial and membrane damage¹⁰; and neurological symptoms were detected in humans exposed to airborne particles of a titanium-based pigment at the workplace¹¹.

Kulcsszavak: nanorészecskék, titán-dioxid, neurotoxicitás, oxidatív stressz

Based on the multitude of applications of nano-TiO₂ mentioned above, and the experiences with other metal oxide nanoparticles applied intratracheally¹², the aim of the present study was to investigate certain general and (electrophysiologically detectable) neurotoxic effects of TiO₂ NPs suspension applied in the airways of rats.

Methods

ANIMALS AND TREATMENT

Young adult male SPF Wistar rats (CrI:WIBr; 6 weeks old, 170±20 g body weight) were used, obtained from Toxi-Coop Ltd. (Budapest, Hun-

gary). The total number of animals was 50, sufficient for $p=0.8$ in power analysis. The rats were kept, two in a cage, in a GLP-rated animal house (12-12 hour light/dark cycle with light on at 06:00; temperature 22 ± 3 °C, 30-70% relative humidity); and could consume unlimited amount (20-30 g/day/animal) of standard rodent food (Ssniff R/M-Z+H, also from Toxi-Coop Ltd., Budapest, Hungary) and water. After one week of acclimation, the rats were randomized to 5 treatment groups of 10 rats each, on the basis of their body weight and spontaneous exploratory activity. The groups and corresponding treatments are shown in **Table 1**.

The TiO_2 NPs used to treat the rats were synthesized as follows: Titanium isopropoxide (TTIP; 7.32 g) was added to 50 ml ethanol (absolute) and stirred for ten minutes. Simultaneously, 20 ml ethanol was mixed in 165.5 ml distilled water and stirred for the same duration. Then, the ethanol-water mix was added dropwise (slowly: one drop per 5 seconds) to the TTIP solution which was continuously stirred at high speed (1200 rpm), and stirring was continued for 30 min after adding all the ethanol-water mix. The TiO_2 nanoparticles generated were collected from the suspension by centrifuging and were dried for 36 hours at 80°C in air. Diameter of the NPs produced, determined by transmission electron microscopy, was ca. 10 nm. The size histograms, in dry and freshly suspended state, are given in **Figure 1**.

Table 1. Groups and treatment

Groups	Code	Treatment
Untreated control	C	–
Vehicle control	VC	PBS-HEC, 1 ml/kg b. w.
Treated, low dose	LD	TiO_2 NPs in PBS-HEC, 1 mg/kg b. w.
Treated, medium dose	MD	TiO_2 NPs in PBS-HEC, 3 mg/kg b. w.
Treated, high dose	HD	TiO_2 NPs in PBS-HEC, 10 mg/kg b. w.

Treatment of the rats was done daily for 28 days (five treatment days/week), always between 8:00 and 10:00 am. The TiO_2 NPs were suspended to the doses given in **Table 1** in PBS (pH 7.4) with 1% hydroxyethyl cellulose (efficient dispersion was aided by sonication using a UP200HT instrument) and were applied to the rats by intratracheal instillation (1 ml/kg b. w. volume) in brief anesthesia (see¹² for details of the technique). Rats in the vehicle control group (VC) underwent the same daily procedure of anaesthesia and instillation while the untreated controls (C) had nothing beyond daily animal care.

Urethane and the chemicals for the NP synthesis were from Sigma-Aldrich. Hydroxyethyl cellulose was obtained at the pharmacy of the Medical Faculty.

GENERAL TOXICOLOGICAL AND CHEMICAL MEASUREMENTS

The rats' body weight was measured every morning, before treatment, to determine the exact daily doses to be instilled and to see the effect on body weight gain.

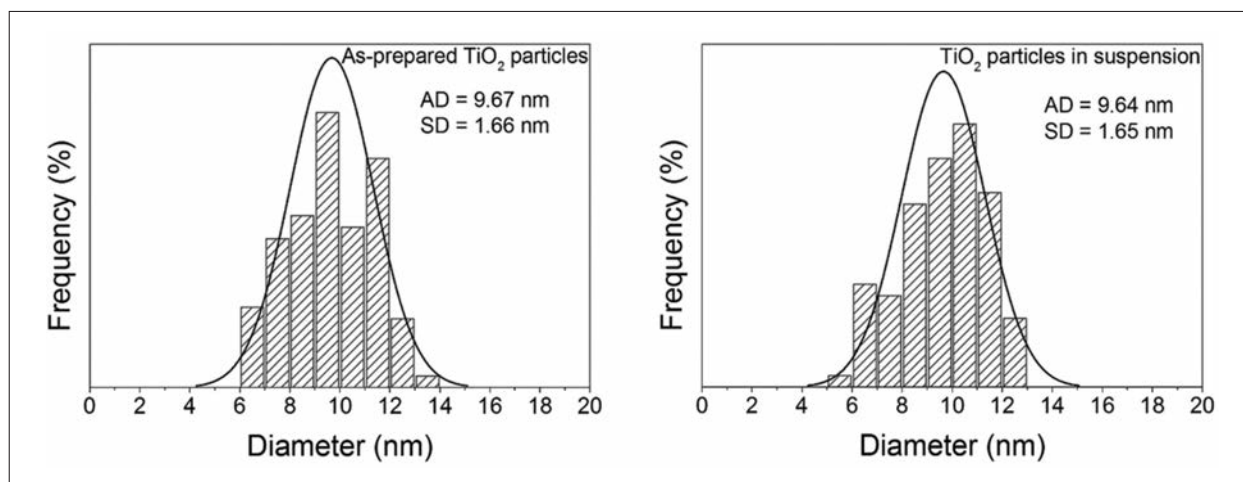


Figure 1. Particle size histograms of the TiO_2 nanoparticles in dry (as-prepared, left graph) and freshly suspended (right graph) state

AD: average diameter; SD: standard deviation.

After electrophysiological recording at the end of the experiment, the rats were sacrificed by an overdose of urethane (twice the anaesthetic dose mentioned below) and were dissected. First, 2–3 ml blood was taken from the abdominal vein of each rat for Ti level and some ROS parameters measurement. Three rats from each group, chosen randomly, were then transcardially perfused with 300 ml saline of 4°C temperature to remove blood from the organs, and were then dissected. The organs heart, kidneys, adrenals, liver, lungs, spleen and thymus were weighed, and relative organ weights (to 1/100 body weight) were calculated. Brain, liver and lung samples were stored at –20°C for Ti level measurement. In another three rats per group, also chosen randomly, dissection was done rapidly right after sacrifice and blood taking. Having the organs weighed, brain, liver and lung samples were shock-frozen in liquid nitrogen and stored at –20°C for subsequent measuring lipid peroxidation, as an indicator of oxidative stress induced by the TiO₂ NPs, using the thiobarbiturate reaction. Ti level from the perfused rats' samples was determined by ICP-MS. For that, the samples were dried to constant weight at 80°C, and were digested as follows: 3 ml cc. HCl/g wet tissue for 90 min at 90°C, then an equal volume of cc. HNO₃ was added and digested for further 90 min. This procedure proved to be necessary to reliably dissolve all TiO₂. The resulting liquid was filtered on 0.45 µm hydrophilic membrane filter and diluted to 100 ml final volume.

ELECTROPHYSIOLOGICAL RECORDING

Electrophysiological recording was done on the day following the last TiO₂ NP administration. In urethane anaesthesia (1000 mg/kg ip.) the left hemisphere was exposed by a sagittal cut in the head skin, blunt removal of connective tissues, then drilling around and removing the left parietal bone. Following recovery (at least 30 min), recording electrodes were placed on the primary somatosensory (SS), visual (VIS) and auditory (AUD) areas. The areas were identified by means of a somatotopic map, and fine positioning of the electrodes was done by searching for the punctum maximum of the evoked responses. A stainless steel clamp, attached to the cut skin edge, was used as indifferent electrode. With the cortical electrode positions finalized, electrocorticogram (ECoG) was recorded for 6 min. Analysis of the ECoG records provided the power spectrum based on standard human EEG bands.

Then, trains of sensory stimuli (SS: electric

shocks [3–4 V, 0.05 ms] to the contralateral whisker pad, VIS: flashes [0.2 ms] from a high-luminance white LED, AUD: clicks [70 dB] through the hollow ear bar of the stereotaxic frame) were applied, and cortical evoked potentials (EPs) recorded from the same sites. One train of 50 stimuli was given with 1 Hz frequency. SS stimulation was repeated with 2 and 10 Hz to see any frequency effect. On the EPs, latency and duration of the main waves was measured manually after averaging.

From the tail nerve, compound action potential (CAP) was recorded by inserting a pair of needle electrodes at the base of the tail for stimulation (3–4 V, 0.05 ms shocks) and another pair 50 mm distally for recording. Conduction velocity was calculated from this distance and the onset latency of the CAP. Relative refractory period was measured by double stimuli with inter-stimulus interval decreased from 10 to 1 ms, based on the extra delay of the second potential. From the data of the SS EPs and the CAPs, it was possible to calculate the ratio of identical parameters (latency or amplitude) of the last and first five potentials from a series of 50, and use this as an indicator of fatigue (as outlined in¹³).

Stimulation, recording and analysis was done using the NEUROSYS 1.11 software (Experimetria Ltd., Budapest, Hungary). For further details of electrophysiological recording and analysis, see¹³.

During the whole study, the principles of the Ethical Committee for the Protection of Animals in Research of the University were strictly followed. The methods used in this work were licensed by the authority competent in animal welfare issues under No. XXI/151/2013.

DATA PROCESSING

From the individual rats' data, group mean and standard deviation was obtained. Depending on the normality of data distribution, checked by Shapiro-Wilk test. Body/organ weight data, of sufficiently normal distribution, were analysed by one-way ANOVA and post hoc Tukey test while for electrophysiological and chemical-biochemical data non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA and post hoc Mann-Whitney U-test was used, with $p < 0.05$ as limit of significance for both. The software used was SPSS version 22.0 (IBM Corp., USA).

The possible linear correlation between data sets was tested by the "linear fit" function of MS Excel. This function uses the least squares method to fit a straight line to the measurement data, and examines the strength of relationship with Fisher's F test.

Results

EFFECT ON BODY AND ORGAN WEIGHT GAIN

The effect of treating the rats with TiO₂ NPs on the body weight gain is shown in **Figure 2**. From the 3rd week on, a significant deficit in body weight gain was observed in the groups *MD* and *HD*, compared to the untreated controls (*C*). A clear difference was also present between the weight gain of the untreated (*C*) and vehicle treated (*VC*) controls, showing that the treatment

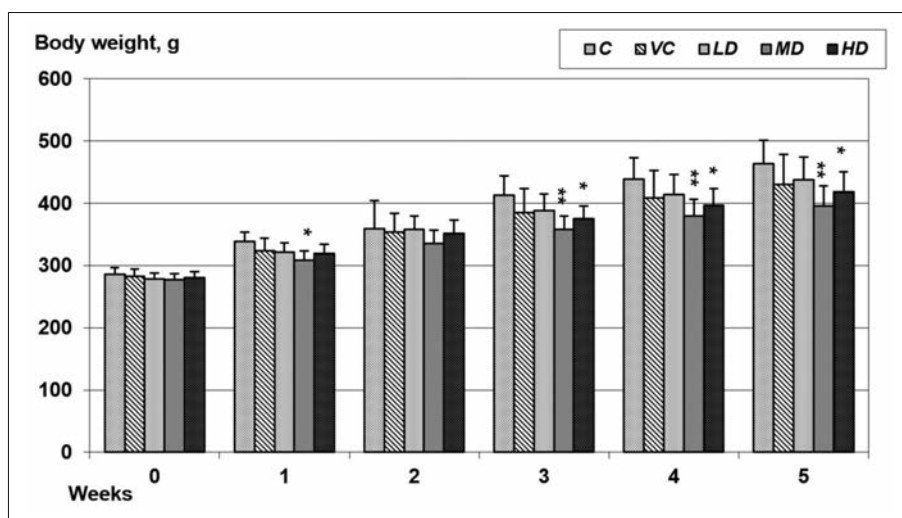


Figure 2. Time course of body weight in the control and treated rats over the weeks of nano-Ti administration. The data shown were measured on Friday of each week

Mean±SD, n=10. *, **: p<0.05, 0.01 vs. C.

Table 2. Relative organ weights (to 1/100 body weight) in the control and treated rats at the end of treatment

Groups	Relative organ weights			
	Brain	Lungs	Kidneys	Liver
C	0.443±0.03	0.303±0.02	0.584±0.02	3.221±0.321
VC	0.483±0.06**	0.559±0.04***	0.632±0.09***	3.153±0.213
LD	0.508±0.07***	0.565±0.09***	0.691±0.09***	3.180±0.183
MD	0.510±0.02***	0.656±0.10***#	0.669±0.09***#	3.183±0.290
HD	0.498±0.04	0.642±0.06***#	0.640±0.07*	3.223±0.361

Mean±SD, n=10. *, **, ***: p<0.05, 0.01, 0.001 vs. C; #: p<0.01 vs. VC.

procedure itself had some effect, but that was not significant. It is also of interest that the strongest effect was seen with the medium, and not the high, dose. In the overall weight gains (*C*: 213.65±34.98 g; *VC*: 177.38±43.39 g; *LD*: 187.66±37.19 g; *MD*: 142.15±16.49 g; *HD*: 165.16±26.61 g) also *MD* vs. *VC* was significant at p<0.05.

The relative weight of the lungs was significantly increased in the groups *MD* and *HD*, both vs. *C* and *VC* (**Table 2**). The increase of the relative brain and kidney weight was significant only vs. *C*. Again, the effect of the medium dose was the strongest. Other organ weights showed no marked alteration.

ELECTROPHYSIOLOGICAL CHANGES

On the cortical EPs, lengthening of the latency was observed in the treated rats, first of all with the two higher doses. Significant lengthening of the SS EP latency, vs. both *C* and *VC* (**Figure 3**) was seen in

group *MD* and *HD*. In these groups, also the frequency-dependent extra lengthening of latency was more marked than in *LD* and both controls. The effect of nano-TiO₂ exposure on the VIS and AUD EPs was similar (**Figure 2**).

The [last 5 / first 5] ratio of the SS EP latency (**Figure 4**) suggested increased fatigability of the peripheral and central structures involved in the generation of evoked potentials, and again showed the non-monotonous dose dependence seen with body weight gain and EP latency.

Conduction velocity of the tail nerve decreased significantly in the *MD* and *HD* rats vs. *C* and *VC* (**Figure 5**). Some increase of the relative refractory period was seen but proved to be non-significant. The [last 5 / first 5] ratio of the tail nerve CAP latencies (**Figure 6**) was similar to that seen with the SS EPs. The change in the ECoG spectrum, a shift to higher frequencies in groups *MD* and *HD* was, in contrast to the evoked activity forms, insignificant (not shown).

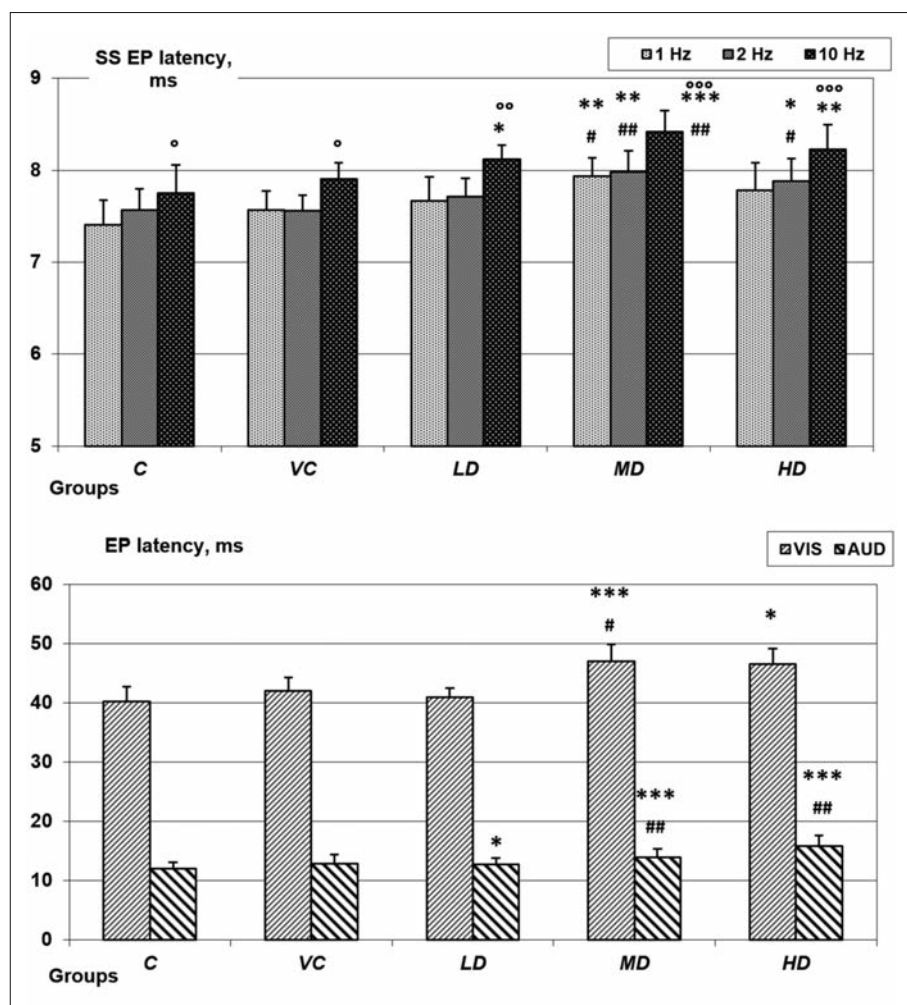


Figure 3. Latency of the somatosensory (upper graph) and visual and auditory (lower graph) cortical evoked potentials

Mean±SD, n=10.

*, **, ***: $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 vs. C; #, ##: $p < 0.05$, 0.01 vs. VC; °, °°, °°°: $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 vs. 1 Hz stimulation within the same group.

TISSUE METAL LEVELS AND BIOCHEMICAL ALTERATIONS

The measured levels of tissue Ti content and lipid peroxidation are shown – only for groups with significant electrophysiological effect, that is, in MD and HD – in **Table 3**. Most of the Ti administered to the rats remained in the lungs but there was a measurable dose-dependent deposition of Ti also in the brain mass, and, with less clarity, in the liver. The low number of measured samples (see Methods) mostly precluded the detection of significant differences but the proportionality of inner Ti levels and lipid peroxidation to the doses applied was clear.

The relationship suggested by the data of internal Ti load, oxidative stress, and functional alter-

ations was tested by examining the possible linear correlations. As seen in **Figure 7**, correlation of moderate strength was found between the latency of SS EP at 10 Hz stimulation (exerting the maximal strain on the somatosensory pathway in this experimental scheme) and the level of Ti and TBARS in the brain samples (in case of the latter, in spite of apparent no-effect at group level). The level of correlation between VIS EP latency and the same chemical parameters was similar (not shown).

Discussion

The results showed that the doses and way of application of TiO_2 NPs to rats, as performed in the present experiment, were effective in creating internal load and inducing signs of general and nervous system toxicity. According to the measured tissue Ti levels, most of the amount applied remained in the lungs but the load measured in the brain and other organ samples

was also considerably higher than in the rats without nano- TiO_2 exposure. The high degree of deposition of TiO_2 NPs in the lungs was in similar to the observation in⁷ that a single amount instilled in the trachea of rats was completely retained in the lungs for 7 days.

The adequacy of the model is determined, however, also by the relationship of the experimentally generated exposure to that described in exposed humans and to the relevant limit values. There are not many data available on occupational airborne Ti exposure. Those published in¹⁴ show that in Europe and North America there were no workplace levels above 1 mg/m^3 (for the whole respirable fraction) in the last 20 years. Recommended exposure limits of NIOSH³ from 2011 are 2.4 mg/m^3 for suspended

TiO₂ dust and 0.3 mg/m³ for ultrafine dust (that is, for TiO₂ NPs) in a 4×10 hours per week exposure scheme. Calculating with the daily ventilation volume of rats¹⁵, the dose of TiO₂ NP applied in the rats' trachea in the present study would be equal to atmospheric concentrations of ca. 5, 15 and 50 mg/m³. These are about one degree of magnitude higher than the limit recommended by NIOSH, but the length of exposure, 28 days, is a relatively short fraction (ca. 1/30) of the expectable life span of rats and would thus correspond to ca. 2.5 years in humans (a relatively short part of a job career).

Due to the tendency of NPs to induce oxidative stress in living organisms, and the especial sensitivity of the nervous system to that (mentioned in Introduction), ROS generation by TiO₂ NPs in various experimental settings both *in vitro* and *in vivo*¹ is an important aspect of possible CNS effects. *In vitro* studies indicated mitochondrial damage and ROS generation on exposure to TiO₂ NPs in human neuronal and glial cell lines¹⁰. The tendency of NPs to migrate to the mitochondria and interfere with oxidative phosphorylation⁴ might have contributed to that.

Oxidative damage to membrane lipids is likely to result in changes of membrane fluidity and this way in alterations of pulse propagation and synaptic transmission¹⁶. The causal chain from inner exposure through oxidative stress up to functional alteration was suggested by the results of the present work in the relationship of SS EP latency and the level of Ti and TBRAS in the brain (Figure 6). The similar pattern of changes of EP latency and

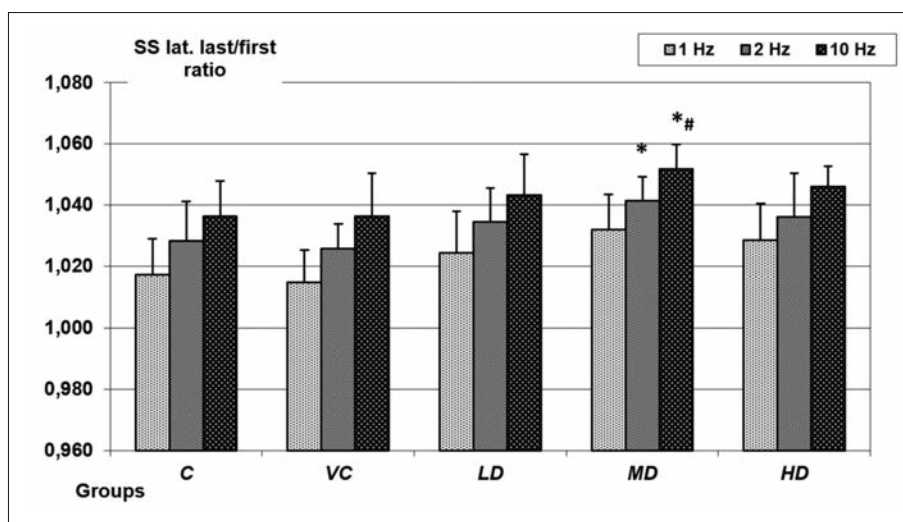


Figure 4. Fatigue of the SS EPs during a series of 50 stimuli, quantified by the ratio of the last and first EPs' latencies (see Methods for details)

Mean±SD, n=10.

*: p<0.05 vs. C.

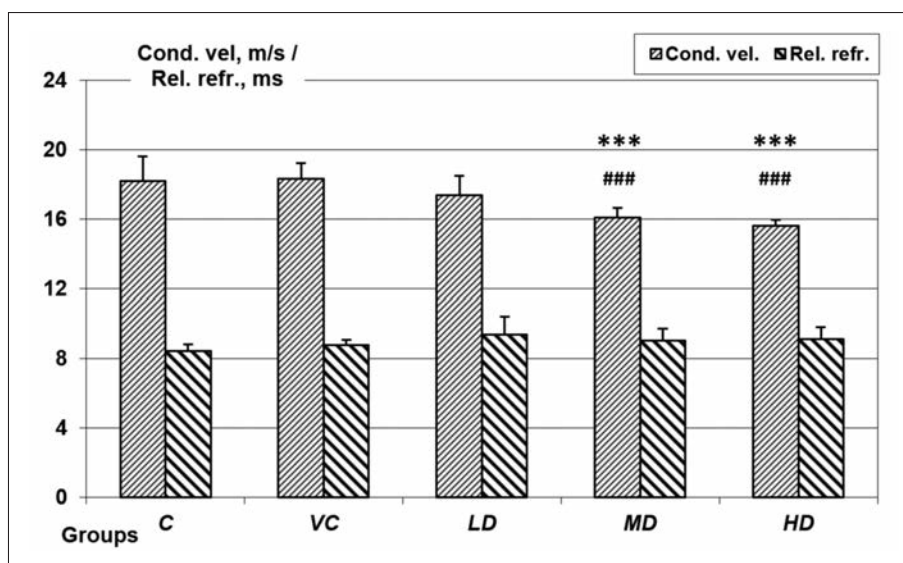


Figure 5. Conduction velocity and relative refractory period of the tail nerve in the control and treated rats

Mean±SD, n=10.

***: p<0.001 vs. C; ###: p<0.001 vs. VC.

tail nerve conduction velocity suggested that the effect of TiO₂ NPs on axonal conduction and synaptic transmission were both involved in the mechanism of the observed changes. In⁸, spike rate in a cultured neuronal network (including both neurons and glial cells) decreased and the number of ROS-positive cells increased in parallel. It was also found, however, that neuronal activity was first impaired at a much lower TiO₂ NP dose than where ROS production started to increase, suggesting con-

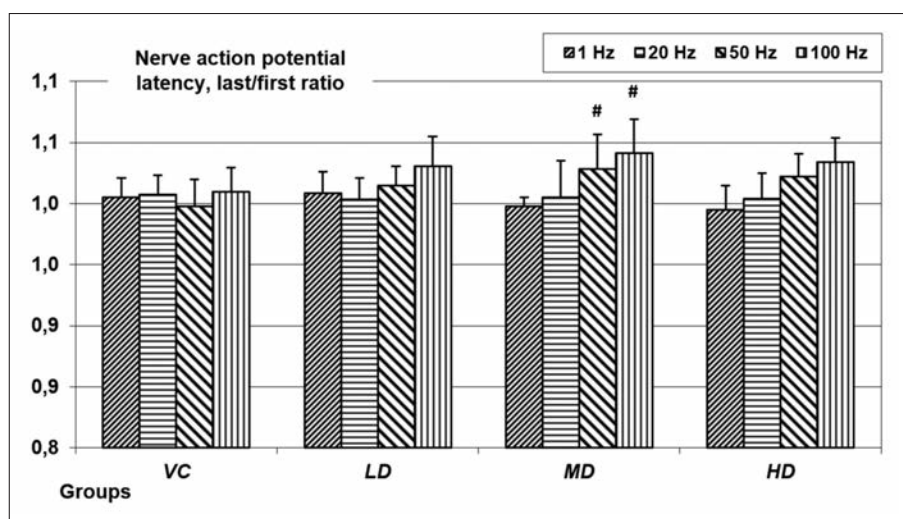


Figure 6. Fatigue of the tail nerve action potential during a series of 50 stimuli, quantified by the ratio of the last and first CAPs' latencies (see Methods for details)

Mean±SD, n=10.

#: p<0.05 vs. VC.

tribution of another, not oxidative, mechanism such as abnormal transmitter turnover, i.e., impaired removal by glial cells⁶ and/or disturbed metabolism in the liver¹⁷. The non-monotonous relationship, between cortical and peripheral electrophysiological changes and brain TBARS levels on one hand and applied TiO₂ NP doses and measured tissue Ti levels on the other, was a peculiar phenomenon. Its possible background was that TiO₂ NPs in the HD treatment suspension had, in spite of

Table 3. Results of Ti level and TBARS determinations in the tissue samples from 3 randomly chosen rats per group of groups VC, MD and HD

Measured parameters	Tissue sample	VC	MD	HD
Tissue Ti level (μg/kg)	brain	1739.58±639.05	3703.62±1161.03	4785.98±1316.65
	liver	651.30±568.52	771.78±91.90	2267.24±631.31 [#]
	lungs	353.96±611.34	492642.37±214699.00 ^{##}	551847.60±65797.20 ^{##}
TBARS reaction (nM MDA/mg tissue)	brain	13.68±0.85	14.72±1.56	13.73±0.20
	liver	16.22±1.48	24.11±1.58	25.49±5.88
	lungs	34.62±6.61	46.40±7.80	49.72±2.96

#: p<0.05; ##: p<0.01 vs. VC, n=3.

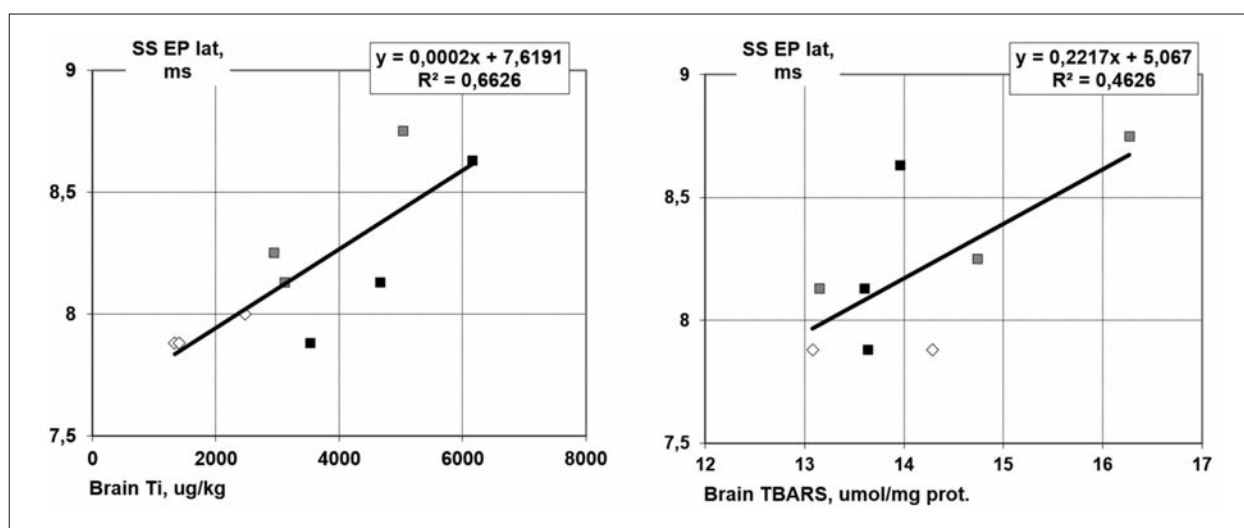


Figure 7. Correlation diagrams showing the strength of relationship of SS EP latency obtained with 10 Hz stimulation to brain Ti levels (left graph) and brain lipid peroxidation (right graph). Each point represents the data pairs of one animal (diamonds, VC; grey squares, MD, black squares, HD)

the stabilizing agent HEC and sonication, an increased tendency to aggregate, resulting in decreased relative surface, diminishing both surface reactions and dissolution of ionic Ti.

Lipid peroxidation was considerable in both brain and liver samples of the treated rats (**Table 3**) but, as judged from the relative organ weights (**Table 2**), the resulting damage in these organs was not gross. In the liver, however, the turnover of monoaminergic transmitters could be disturbed, as mentioned in¹⁷, possibly contributing to the neuro-functional alterations. The metabolic disturbance suggested by increased presence of free radicals in

the liver could also provide explanation of the reduced body weight gain seen in groups *MD* and *HD* of the treated rats¹⁸. Increased relative kidney weight (**Table 2**) was another indication of systemic effect of TiO₂ NPs and (as stated in¹) ROS-induced damage.

The results of the present study underlined the possible neurotoxicity of TiO₂ NPs, but left some questions open. The possible role of Ti dissolved from the NPs, as well as the histological changes possibly evolving in parallel to the observed neuro-functional and biochemical ones, need further investigations.

REFERENCES

1. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Part Fibre Toxicol 2013;10:15.
<http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-10-15>
2. Warheit DB, Donner EM. Risk assessment strategies for nanoscale and fine-sized titanium dioxide particles: Recognizing hazard and exposure issues. Food Chem Toxicol 2015;85:138-47.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.07.001>
3. NIOSH. Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Current Intelligence Bulletin 63. Department of Health and Human Services (National Institute of Occupational Safety and Health) Publication No. 2011-160.
<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/>
4. Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect 2005;113: 823-39.
<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.7339>
5. Guerra-Araiza C, Álvarez-Mejía AL, Sánchez-Torres S, Farfan-García E, Mondragón-Lozano R, Pinto-Almazán R, et al. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. Free Rad Res 2013;47:451-62.
<http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2013.795649>
6. Liu Y, Xu Z, Li X. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in rat neuroglia cells, Brain Injury 2013;27:934-9.
<http://dx.doi.org/10.3109/02699052.2013.793401>
7. Baisch BL, Corson NM, Wade-Mercer P, Gelein R, Kennell AJ, Oberdörster G, Elder A. Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. Part Fibre Toxicol 2014;11:5.
<http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-11-5>
8. Gramowski A, Flossdorf J, Bhattacharya K, Jonas L, Lantow M, Rahman Q, et al. Nanoparticles induce changes of the electrical activity of neuronal networks on micro-electrode array neurochips. Environ Health Perspect 2010; 118:1363.1369.
<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0901661>
9. Ze Y, Sheng L, Zhao X, Ze X, Wang X, Zhou Q, et al. Neurotoxic characteristics of spatial recognition damage of the hippocampus in mice following subchronic peroral exposure to TiO₂ nanoparticles. J Hazard Mat 2014;264: 219-29.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.072>
10. Coccini T, Grandi S, Lonati D, Locatelli C, De Simone U. Comparative cellular toxicity of titanium dioxide nanoparticles on human astrocyte and neuronal cells after acute and prolonged exposure. NeuroToxicology 2015;48:77-89.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.03.006>
11. Oleru UG. Respiratory and nonrespiratory morbidity in a titanium oxide paint factory in Nigeria. Am J Ind Med 1987;12:173-80.
<http://dx.doi.org/10.1002/ajim.4700120206>
12. Oszlanczi G, Horváth E, Szabó A, Horváth E, Sági A, Kozma G, et al. Subacute exposure of rats by metal oxide nanoparticles through the airways: general toxicity and neuro-functional effects. Acta Biol Szeged 2010;54:165-70.
13. Papp A, Pecze L, Vezér T. Dynamics of central and peripheral evoked electrical activity in the nervous system of rats exposed to xenobiotics. Centr Eur J Occup Environ Med 2004;10:52-9.
14. Hext PM, Tomenson JA, Thompson P. Titanium dioxide: Inhalation toxicology and epidemiology. Ann Occup Hyg 2005;49:461-72.
<http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/mei012>
15. Strohl KP, Thomas AJ, St.Jean P, Schlanker EH, Koletsky RJ, Schork NJ. Ventilation and metabolism among rat strains. J Appl Physiol 1997;82:317-23.
16. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. Science 1993;262:689-95.
17. Yurdaydin C, Hörtnagl H, Steindl P, Zimmermann C, Piffl C, Singer EA, et al. Increased serotonergic and noradrenergic activity in hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced acute liver failure. Hepatology 1990; 12:695-700.
18. Merry BJ. Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. Int J Biochem Cell Biol 2002;34:1340-54.

DIFFERENT WORK SCHEDULES OF NURSES IN HUNGARY AND THEIR EFFECTS ON HEALTH

Katalin FUSZ¹, Ákos TÓTH², Bernadett VARGA¹, Nóra ROZMANN¹, András OLÁH¹

¹Pécsi Tudományegyetem, Egészségtudományi Kar, Ápolástudományi, Alapozó Egészségtudományi és Védőnői Intézet, Pécs

²Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Sporttudományi és Testnevelési Intézet, Pécs



English | <http://dx.doi.org/10.18071/isz.70.0136> | www.elitmed.hu

Introduction – The shift work is burdensome for nurses and may lead to health problems.

Aims – The purpose of the study was to examine the nursing shift system types and to analyse the effects on nutritional status, subjective state of physical and mental health in case of different shift schedules.

Method – In the first phase of the research 326 nurses working in changing shifts filled out the Bergen Shift Work Questionnaire after adaptation into Hungarian. 518 nurses participated in our second study in hospitals of the South-Danubian Region, in clinics of University of Pécs and at trainings organized by the Faculty of Health Sciences of the University of Pécs.

Results – Based on the psychometric characteristics of Bergen Shift Work Questionnaire technically it is suitable for the examination of sleeping disorders associated with shift work. Sleeping quality is worse in those working in irregular work shifts compared to those working in regular and flexible work schedules ($p < 0.001$). The irregular work schedule is worse than the regular work schedule according to 76.6% of the nurses. According to 63.8% of the respondents the following regular work schedule is the best: after one 12-hour day shift one 12-hour night shift, followed by two days of rest. The average Body Mass Index (BMI) is 26.16 kg/m². Since the nurses work in shift work 47.7% of them reported weight gain. Among the psychosomatic symptoms the most frequent is back pain (78.4%) related elevated BMI ($p = 0.013$). The nurses' sense of coherence on average is 61.76 points. In case of full-time employees the sense of coherence is better than those who work in shifts ($t = 2.933$, $p = 0.004$). The nurses working irregular shift work assess their health worst (mean rank: 166.61; $p = 0.019$), and their sense of coherence is lower ($p = 0.04$).

Conclusion – The irregularity of work schedules is stressful for nurses. Due to the health of nurses it would be useful to establish the least exhausting work schedules.

Keywords: shift work, work schedules, sleep disorders, sense of coherence

KÜLÖNBÖZŐ ÁPOLÓI MUNKARENDEK HAZÁNKBAN ÉS EGÉSZSÉGRE GYAKOROLT HATÁSAIK

Fusz K; Tóth Á, PhD; Varga B; Rozmann N; Oláh A, PhD
Ideggyógy Sz 2017;70(3-4):136-139.

Bevezetés – A váltott műszak megterhelő az ápolóknak, és egészségi problémákhoz vezethet.

Cél – Kutatásunk célja volt a különböző ápolói munkarend-típusok feltérképezése, és az ápolók tápláltsági állapotára, szubjektív fizikális és mentális egészségére kifejtett hatások elemzése.

Módszer – Az első vizsgálatban 326, váltott műszakban dolgozó ápoló töltötte ki a Bergen Shift Work Questionnaire-t, miután adaptáltuk magyar nyelvre. A második felmérés során összesen 518 ápoló töltötte ki a kérdőívet dél-dunántúli kórházakban, a Pécsi Tudományegyetem klinikáin és az Egészségtudományi Kar szervezésében tartott továbbképzések szüneteiben.

Eredmények – A Bergen Váltott Műszak Alvás Kérdőív (BSWSQ-H) megfelel a szükséges pszichometriai előírásoknak, amely lehetővé teszi a diszkrét álmatlanság tüneteinek vizsgálatát különböző műszakokban. A szabálytalan munkarendben dolgozó ápolók alvászminősége rosszabb, mint a szabályos és flexibilis munkarendben dolgozóké ($p < 0.001$). A válaszadók 76,6%-a szerint a szabálytalan munkarend rosszabb, mint a szabályos. Az ápolók 63,8%-a szerint az alábbi szabályos munkarend a legjobb: egy 12 órás nappali műszak után egy 12 órás éjszakai műszak, majd két pihenőnap. Az átlagos testtömegindex 26,16 kg/m², mely túlsúlyt jelez. A váltott műszak kezdete óta 42,7%-nál súlygyarapodás lépett fel. A pszichoszomatikus panaszok közül a hát- és derékfájás a leggyakoribb (78,4%), mely összefügg a testtömegindex emelkedésével ($p = 0.013$). Az ápolók koherenciaérzete átlagosan 61,76 pont. A nappali munkarendben dolgozók koherenciaérzete jobb, mint a váltott műszakban dolgozóké ($p = 0.004$). A szabálytalan munkarendű ápolók rosszabbnak ítélték az egészségi állapotukat ($p = 0.019$), és koherenciaérzetük is alacsonyabb ($p = 0.04$).

Következtetés – A munkarend szabálytalansága megterhelő az ápolók számára. Az ápolók egészsége miatt célszerű a legkevésbé megterhelő ápolói munkarendeket kialakítani.

Kulcsszavak: váltott műszak, munkarendek, alvászavar, koherenciaérzet

Correspondent: Dr. OLÁH András, Faculty of Health Sciences, University of Pécs;
7621 Pécs, Vörösmarty utca 4. E-mail: andras.olah@etk.pte.hu

Érkezett: 2016. október 24. Elfogadva: 2016. december 13.

Due to the need for continuous health care most nurses have to work at night, which is harmful to health as it disturbs biological rhythm^{1, 2}. The work schedules influence the health behavior and health status. Sleep disorders, depression and cancer may occur more frequently among shift-workers than non-shift workers^{3, 4}. Among nurses there are a wide variety of work schedules, for example regular, irregular and flexible, 8- and 12-hour schedules. *Griffiths* and colleagues found that in the case of 12-hour (or longer) shifts patient safety and quality of care declines⁵. Only 15% of the 31 627 nurses involved in the survey in 12 European country work in 12 hour shifts. A few studies examine the difficulties of work schedule planning, *Legrain* and colleagues analysed the problems and proposed two software applications that facilitate the creation of schedules⁶.

The aim of the first study was to confirm the correlations between different nursing work schedules and sleep problems, with the application of the Bergen Shift Work Sleep Questionnaire (BSWSQ)⁷. The first step is the adaptation of the questionnaire in domestic conditions, the translation of questionnaire into Hungarian language, as well as checking the validity of psychometric methods.

The aim of the second survey was the analysis of subjective state of physical and mental health in case of different shift schedules and to assess which is the most popular, and which is the least favourite work schedule. The main element of the salutogenesis model is the sense of coherence, which is valid factor for health. The sense of coherence is a resource that enables people to manage tension, to reflect their internal and external resources, to mobilise those resources, to resolve tension in a health-promoting manner⁸.

Method

SAMPLE

Quantitative, descriptive, cross-sectional studies were performed. The survey consisted of two parts, a total of 844 nurse took part in the research.

The application of Bergen Shift Work Sleep Questionnaire (BSWSQ) at four clinics at the Clinical Center of the University of Pécs, as well as a nationwide online survey was conducted 326 shift workers nurse participated from 500 invited nurses (so the response rate was 65.2%).

In our second research 518 nurses participated from 800 invited nurses (so the response rate was 64.8%). The nurses took part in the study in four hospitals of the South-Danubian Region, in four clinics of University of Pécs and under the organization of the Faculty of Health Sciences, University of Pécs (**Table 1**).

MEASUREMENT TOOLS

The Bergen Shift Work Sleep Questionnaire adapted into Hungarian language (Bergen Váltott Műszak Alvás Kérdőív, BSWSQ-H) examines sleep quality and its effects on awakening in shift workers in case of different shifts⁹. The five-point Likert scales measure the frequency of individual complaints, and higher scores indicate poorer sleep quality. The convergent and discriminant validation of the questionnaire was made with the help of Perceived Stress Scale and Athens Insomnia Scale^{10, 11}.

The questionnaire of the second study measures the sense of quality, the quality of sleep, frequency of psychosomatic symptoms and in addition it measures the work schedule regularity (regular, flexible and irregular). We used the Sense of Coherence Scale (SOC-13; Antonovsky, 1979) to analyse the subjective state of physical and mental health¹². A higher score means a higher sense of coherence (maximum score: 91).

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 software package (SPSS, Chicago, IL).

In addition descriptive statistical analysis (absolute and relative frequency, mean, standard deviation), variance analysis and Scheffe post hoc test were applied. The questionnaires were inner-checked with Cronbach's alpha reliability. Dimensions covered by the survey BSWSQ-H were explored

Table 1. Demographic data of the two sample

Demographic data		1. study at PTE and nationwide (n=326)	2. study at PTE and South-Danubian Region (n=518)
Age	mean (SD)	39.492 years (9.74) (min: 20; max 66)	42.44 years (9.59) (min: 21; max: 61)
Sex (female)	prevalence	93.2%	93.1%

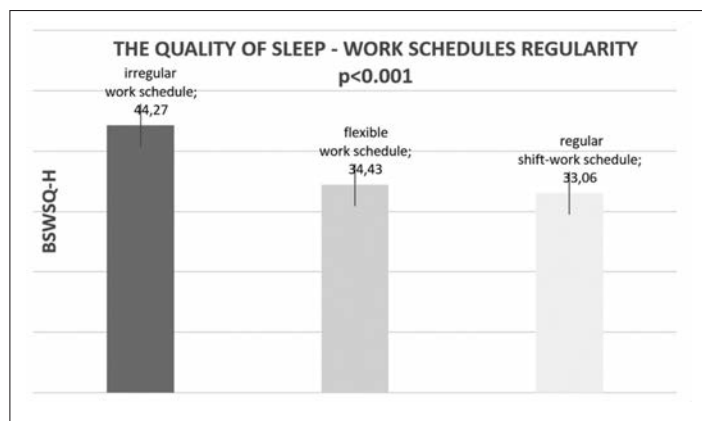


Figure 1. The quality of sleep in the case of different regularity work schedules (n=233)

with factor analysis (principal component analysis method, using varimax rotation). The comparison per shifts of some responses in the BSWSQ-H were performed with consistent pattern variance analysis, pairwise comparisons and Bonferroni correction. Pearson's correlation coefficient was calculated to measure convergent and discriminant validity and test-retest reliability. The results in case of each tests were considered to be significant at $p<0.05$.

Results

The Hungarian version of Bergen Shift Work Sleep Questionnaire (BSWSQ-H) meets the required psychometric standards, which enables a systematic analysis of the discrete insomnia symptoms in those working different shifts. The quality of sleeping improves by the age progress ($R=0.16$; $p=0.017$), but the gender, the marital status and the education does not affect it. There is no difference between distinct classes or the used type of the lightning in the night shift, or the usage of any kind of stimulant like coffee, energydrink.

The quality of sleep and daytime fatigue is related to the work schedule regularity: the most sleeping problems can be experienced in case of irregular working schedules in each shift ($p<0.001$) compared with regular and flexible working order (Figure 1).

According to 76.6% (n=271) of the nurses irregular work schedules are more stressful than regular. The worst from the regular shift-work schedules was found to be the following (49.3%): after five 8-hour day shift two rest days, and after five afternoon shifts two rest days, then five night shifts. According to 63.8% of the respondents the follo-

wing work schedule is the best, the least hard: after one 12-hour day shift one 12-hour night shift, followed by two days of rest. The most favourite regular work schedule is the most common in Hungary.

The nurses 52.8% (n=187) feel that their health state is adequate, 35.6% think is good and 4.5% say is excellent. 25 of them (7.1%) report bad health state.

The nutritional state was determined by the Body Mass Index, its average was 26.16 kg/m^2 (SD: 4.79; min: 15; max: 48). Since the start of shift work 42.7% of the nurses report weight gain, while 87 of them (16.8%) lose weight. The responders' 39.7% (n=141) suffer in chronic disease, the most frequent is hypertonia (n=81; 22.8%). The frequency of the psychosomatic symptoms was measured for the last one month as well, back and waist pain were reported most frequently (mean: 8.45). The average point of the sense of coherence was 61.76 (SD: 11.79; min: 23; max: 89).

Those who work in irregular shift report their health the worst (mean: 166.61; $p=0.019$). According to our results those who work in day-shift eat more healthier ($p=0.013$) and do more physical activities ($p=0.016$). The average point of those working in shifts for all psychosomatic complaints frequency is higher (30.14 average point) than those working in non-shift work (21.84 average point; $p=0.031$). The incidence of chronic diseases was not influenced by the different work shift schedules ($p>0.05$).

One dimension of health, the sense of coherence was influenced by the type of work schedule. The day-shift workers (n=61) got 65.84 point on average in the SOC 13 questionnaire, while the shift workers (n=284) achieved on average 61.02 point, so for those who work in day-shift the sense of coherence is better ($t=2.933$; $p=0.004$). The sense of coherence of irregular work schedule workers is lower (n=49; average point: 58.19) than the flexible work schedule workers' (n=109; average point: 63.17; $p=0.04$) (Figure 2).

Discussion

In Hungary most of the nurses work in flexible work schedule, which is not regular, but the individual preferences are taken into account before the schedule is drawn up^{13, 14}. The irregular work schedule is worse than the regular work schedule according to 76.6% of the nurses in our study. According to 63.8% of the respondents the following work schedule is the least burdensome: after one 12-hour day shift one 12-hour night shift, followed by two

days of rest. The most favourite regular work schedule is the most common regular schedule in Hungary.

The average Body Mass Index is 26.16 kg/m²; the 48.3% (n=250) of the responders are overweight or obese. We did not find significant difference between the BMI of day-shift workers and shift workers (p=0.103), but according to Smith and colleagues the shift workers' BMI is higher¹⁵. Since the nurses work in shift work 47.7% of them reported weight gain.

Among the psychosomatic symptom most common is back pain (78.4%) related elevated BMI (p=0.013). The frequency of psychosomatic complaints is higher in shift work than among full-time workers (p=0.031).

The nurses' sense of coherence on average is 61.76 points. In full-time employees the sense of coherence better than those working in shifts (t=2.933, p=0.004). The nurses working irregular shift work assess their health worst (mean rank: 166.61; p=0.019), and their sense of coherence is lower (p=0.04).

The work schedules influence to the health behavior and health status. The irregularity of work schedules is stressful for nurses. Due to the health

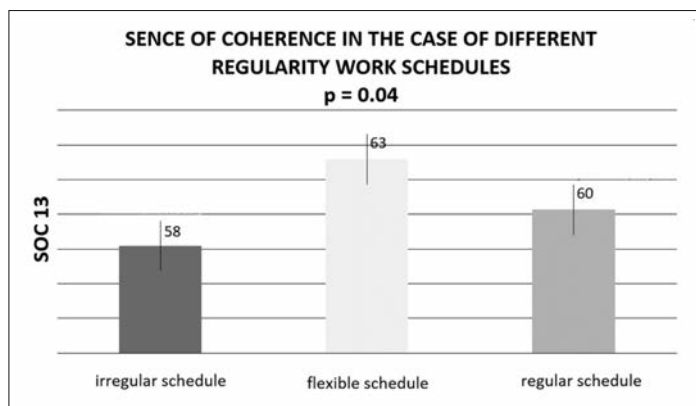


Figure 2. Sense of coherence in the case of different regularity work schedules (n=158)

of nurses it would be practical to establish the least exhausting nursing work schedules.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary. We thank those nurses who filled out the questionnaire.

REFERENCES

1. Ha M, Park J. Shiftwork and metabolic risk factors of cardiovascular disease. *Journal of Occupational Health* 2005;49:89-95.
<https://doi.org/10.1539/joh.47.89>
2. Halmos T, Suba I. The role and significance of diurnal rhythm in the clinical. A napi ritmus szerepe és jelentősége a klinikumban. *Magyar Tudomány* 2013;174(1):96-103. [Hungarian]
3. Flo E, Pallesen S, Magerøy N, et al. Shift work disorder in nurses – Assessment, prevalence and related health problems. *PLoS ONE* 2012;7(4):e33981.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033981>
4. Hansen J, Stevens RG. Case-control study of shift-work and breast cancer risk in Danish nurses Impact of shift systems. *Eur J Cancer* 2012;48:11:1722-9.
5. Griffiths P, Dall'Ora C, Simon M, et al. Nurses' shift length and overtime working in 12 european countries – The association with perceived quality of care and patient safety. *Med Care* 2014;52(11):975-81.
<https://doi.org/10.1097/MLR.0000000000000233>
6. Legrain A, Bouarab H, Lahrichi N. The nurse scheduling problem in real-life. *J Med Syst* 2015;39:160.
<https://doi.org/10.1007/s10916-014-0160-8>
7. Flo E, Bjorvatn B, Folkard S, et al. A reliability and validity study of the Bergen Shift Work Sleep Questionnaire in nurses working three-shift rotations. *Chronobiol Int* 2012;29(7):937-46.
<https://doi.org/10.3109/07420528.2012.699120>
8. Jeges S, Varga K. Unravelling the mystery of the sense of coherence. *European Journal of Mental Health* 2006;1(1):45-71.
<https://doi.org/10.1556/EJMH.1.2006.1-2.3>
9. Fusz K, Tóth Á, Fullér N, Müller Á, Oláh A. Sleep quality of nurses working in shifts – Hungarian adaptation of the Bergen Shift Work Sleep Questionnaire (Váltott műszakban dolgozó ápolók alvásminőségének vizsgálata a magyar nyelvre adaptált Berger Shift Work Sleep Questionnaire alkalmazásával.) *Orvosi Hetilap* 2015;156(49):2003-8. [Hungarian]
10. Stauder A, Konkoly Thege B. Characteristics of Perceived Stress Scale (PSS) Hungarian version. Az észlelt stressz kérdőív (PSS) magyar verziójának jellemzői. *Mentálhigiéne és Pszichoszomatika* 2006;7(3):203-16. [Hungarian]
11. Soldatos CR, Dikeos DG, Paparrigopoulos TJ. Athens Insomnia Scale: validation of an instrument based on ICD – 10 criteria. *J Psychosom Res* 2000;48(6):555-60.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3999\(00\)00095-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3999(00)00095-7)
12. Antonovsky A. Unraveling the mystery of health . How people manage stress and stay well. San Francisco: Jossey-Bass Publishers; 1987.
13. Fusz K, Pakai A, Kívész Z, Szunomár S, Regős A, Oláh A. Munkarendek a hazai egészségügyi rendszerben és az ápolók alvásminősége. *Orv Hetilap* 2016;157(10):379-84.
<https://doi.org/10.1556/650.2016.30386>
14. Barton J, Costa G, Smith L, et al. The Standard Shiftwork Index: A battery of questionnaires for assessing shiftwork-related problems. *Work & Stress* 1995;9:3-30.
<https://doi.org/10.1080/02678379508251582>
15. Smith P, Fritschi L, Reid A, Mustard C. The relationship between shift work and body mass index among Canadian nurses. *Applied Nursing Research* 2013;26:24-31.
<https://doi.org/10.1016/j.apnr.2012.10.001>

PAZOPANIB INDUCED UNILATERAL POSTERIOR REVERSIBLE ENCEPHALOPATHY SYNDROME

Muhsine Beyza ARSLAN, Arsida BAJRAMI, Elif DEMIR, Murat ÇABALAR, Vildan YAYLA

Bakırköy Dr. Sadi Konuk Training and Research Hospital, Neurology Department, Bakırköy/İstanbul



English | <http://dx.doi.org/10.18071/isz.70.0001> | www.elitmed.hu

PAZOPANIB INDUKÁLTA EGYOLDALI POSTERIOR REVERZIBILIS ENCEPHALOPATHIA SZINDRÓMA

Arslan MB, MD; Bajrami A, MD; Demir E, MD; Çabalar M, MD, PhD; Yayla V, PhD

Ideggyogy Sz 2017;70(3-4):140-144.

Posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) is a reversible clinical and neuroradiological syndrome which may appear at any age and characterized by headache, altered consciousness, seizures, and cortical blindness. The exact incidence is still unknown. The most commonly identified causes include hypertensive encephalopathy, eclampsia, and some cytotoxic drugs. Vasogenic edema related subcortical white matter lesions, hyperintense on T2A and FLAIR sequences, in a relatively symmetrical pattern especially in the occipital and parietal lobes can be detected on cranial MR imaging. These findings tend to resolve partially or completely with early diagnosis and appropriate treatment. Here in, we present a rare case of unilateral PRES developed following the treatment with pazopanib, a testicular tumor vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory agent.

Keywords: posterior reversible encephalopathy syndrome, pazopanib, diffusion magnetic resonance imaging, unilateral

A posterior reverzibilis encephalopathia szindróma (Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome, PRES) reverzibilis klinikai és neuroradiológiai kórkép, ami bármely életkorban jelentkezhet fejfájás, módosult tudatállapot, görcsroham és corticalis vakság formájában. Az állapot pontos incidenciája nem ismert. A leggyakrabban azonosított kiváltó ok a hipertenzív encephalopathia, az eclampsia, illetve egyes citotoxikus szerek. A képalkotó eljárások közül koponya-MR-rel főleg az occipitalis és parietalis lebenyekben mutatható ki nagyrészt szimmetrikus, vazogén oedemához társuló subcorticalis fehérállomány-laesio T2A- és FLAIR-szekvencia-hiperintenzitás formájában. Korai diagnózis és megfelelő kezelés hatására a tünetek részben vagy egészében megszűnnek. A tanulmány az egyoldali PRES ritka esetét mutatja be, ami heretumor terápiájaként alkalmazott vascularis endothelialis növekedési faktor gátló (VEGF) pazopanibkezelés következtében alakult ki.

Kulcsszavak: egyoldali posterior reverzibilis encephalopathia szindróma, pazopanib, MRI, unilateralis

Correspondent: Dr. Muhsine Beyza ARSLAN, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Training and Research Hospital, Neurology Department; Zuhuratbaba Mahallesi, 34147 Bakırköy/İstanbul. E-mail: byzarslan10@gmail.com

Érkezett: 2016. október 22. Elfogadva: 2017. január 2.

Posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) is characterized by headache, altered mental status, seizures, and cortical blindness. It was initially defined as reversible posterior leukoencephalopathy by Hinchey et al. in 1996, and nowadays the PRES term is generally used. MRI findings consist of bilateral symmetrical focal vaso-

genic edema in the subcortical white matter, and more rarely in the cortex localized usually in the occipital and parietal lobes, typically. Less often brainstem, cerebellum, basal ganglia, frontal and temporal lobe involvement has also been reported¹⁻³. Although typically described as bilateral, in 2.6% of the cases, unilateral involvement was

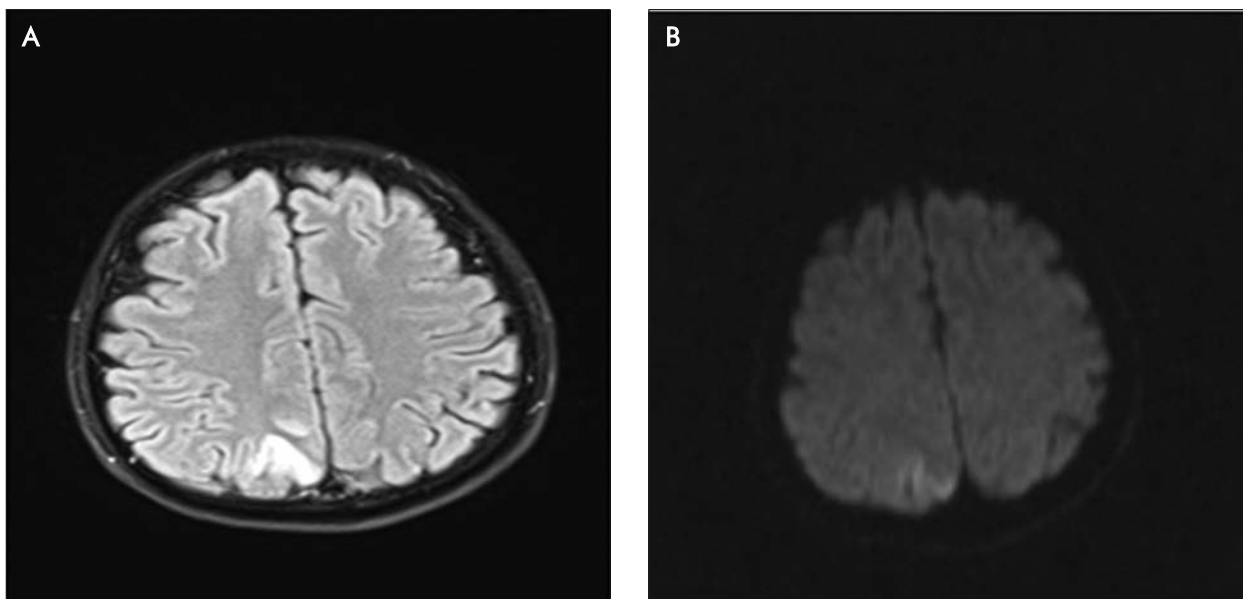


Figure 1A, B. A cortico-subcortical focal area with hyperintense signal changes in T2-FLAIR and diffusion-weighted MR imaging, in right parietooccipital region

noticed⁴. Multitude condition such as hypertension, various cytotoxic drugs, preeclampsia-eclampsia and autoimmune mechanisms have been implicated in its etiology⁵⁻⁷. Cytotoxic edema and irreversible brain damage may develop if left untreated or the underlying etiologic factors are not eliminated. We herein report the rare case of a patient with unilateral PRES induced from administration of pazopanib, a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory agent used in the treatment of testicular tumor.

Case

A 33-year-old man was admitted to our emergency department with vision loss in both eyes noticed in the morning following one day history of headache, nausea and vomiting. Generalized tonic-clonic convulsions lasting 1-2 minutes were observed on admission. His medical history revealed Behcet's disease since five years. He also stated that he had discontinued his medical follow up and treatment following 1-year history of colchicines use. The patient underwent a testicular tumor operation 4-5 months prior to the admission and had been using oral VEGF inhibitor, pazopanib (400 mg/day) since. Neurological examination was unremarkable except for bilateral cortical blindness. Blood pressure on admission was 120/70 mmHg. On laboratory examinations leukocyte count was 7700/mm³, hematocrit level 46%, hemoglobin concentration

15.2 g/dl, platelet count was 121000 /mm³, urea 32 mg/dl, creatinine 0.86 mg/dl, sodium 136 mmol/l, potassium 3.36 mmol/l, calcium 9.9 mg/dl, total protein 7.88 g/dl, albumin 4.48 g/dl. Liver enzyme levels were unremarkable. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein were also normal. A cortico-subcortical focal area with hyperintense signal changes in T2-FLAIR MRI was observed in right parietooccipital region (**Figure 1A, B**). Magnetic resonance angiography (MRA) was unremarkable without showing any signs of cerebrovascular irregularities, segmental stenosis or vasospasm. These radiological findings together with normal inflammatory markers ruled out Behcet's disease. Electroencephalography (EEG) evaluation was normal. The patient was diagnosed with pazopanib induced clinically and radiologically unilateral PRES. Pazopanib treatment was discontinued after consulting with the oncologist. Seizures were not observed following the treatment with levitiresetam (initial dosage 500 mg/day tapered to 1000 mg/day as maintaining dosage). Headache, nausea and vomiting improved within 60 hours and cortical blindness recovered uneventfully. Complete resolution of the previously noted lesions was noticed one month later (**Figure 2A, B**).

Discussion

PRES, is a clinical and neurological syndrome that can be seen at any age, due to various etiologies

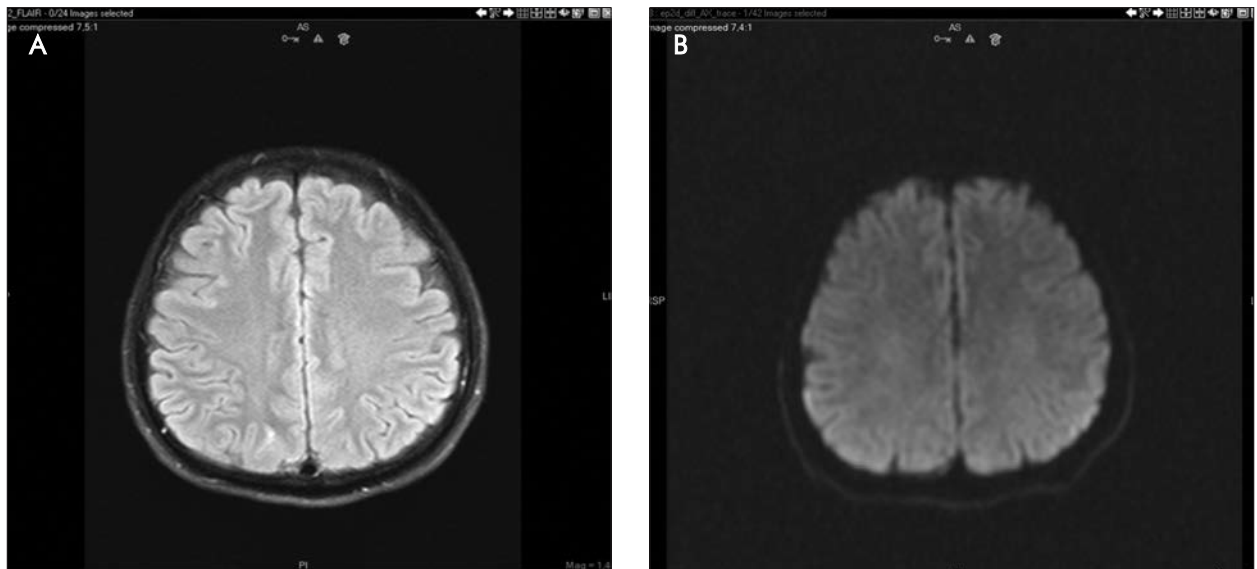


Figure 2A, B. One month later, T2-FLAIR and diffusion-weighted sequence

with an unknown incidence⁸. The common causes of PRES include hypertension, eclampsia, immunosuppressive and cytotoxic drugs, lupus nephritis, collagen vascular diseases, thrombotic thrombocytopenic purpura, HIV infection, acute intermittent porphyrias, Guillain-Barré syndrome, hemolytic uremic syndrome, Wegener's granulomatosis, celiac disease, chronic renal failure, sepsis and organ transplantation^{9–17}. Although the pathophysiology is poorly understood, the most widely accepted theory is the hypertension/hyperperfusion theory. Under normal circumstances cerebral blood flow tends to be maintained constant through cerebral autoregulation. According to this theory, dilation of cerebral arterioles, hyperperfusion, vascular endothelial damage occur secondary to sudden increase of blood pressure. This situation can cause blood brain barrier breakdown leading to gray and white matter vasogenic edema and reversible ischemia. In a lesser extent, approximately 20–30% of cases, PRES following normal or slightly elevated blood pressure have also been reported¹⁸.

In a study conducted by Demirtas et al. PRES cases were divided into three main groups according to the pathogenesis: posterior circulation lesions following high blood pressure were categorized as the first group. The second group includes patients with normal blood pressure developing posterior circulation lesions secondary to preeclampsia/eclampsia and cytotoxic drugs and endothelial damage is thought to play a fundamental role in this group. Symmetrical basal ganglia, thalamus, cere-

bellum and brain stem lesions developed secondary to metabolic disorders such as hemolytic uremic syndrome, uremic encephalopathy accompanied by normal blood pressure consists the third group¹⁹. The clinical and radiological findings of our case best fits to the pathophysiology described in the second group.

The radiological differential diagnoses of PRES include cerebrovascular disease, neoplasia, and encephalitis, inflammatory and infectious processes, demyelinating disease²⁰. Cranial MRI is the gold standard for diagnosis. Bilateral cortical-subcortical hyperintense lesions on FLAIR and T2-weighted images in the parietooccipital regions and more rarely in brain stem, cerebellum, basal ganglia, frontal and temporal lobes are usually present. The posterior circulation is more sensitive to sudden changes in blood pressure compared to the anterior circulation area due to the lack of adrenergic nerves around the pial and intracerebral vessels¹⁷. In a study examining the imaging findings of PRES, the frequency of parietooccipital involvement was found to be 98.7%, 78.9% in posterior frontal, 68.4% in temporal, 34.2% in cerebellum, 30.3% in thalamus, 18.4% in brain stem and 11.8% in basal ganglia.

These manifestations are often observed bilaterally and the unilateral variants have been described in only 2.6% of the cases⁴. Diffusion-weighted MRI (DW-MRI) and ADC maps are used to differentiate vasogenic and cytotoxic edema in patients with PRES. Vasogenic and cytotoxic edema appear

hyperintense on DW-MRI and vasogenic edema appears isointense or hyperintense, but cytotoxic edema appears hypointense on the ADC map¹⁹⁻²⁰. The diffuse presence of vasogenic edema in PRES indicates poor prognosis and it has been reported that aggressive treatment is necessary. Severe vasogenic edema can be transformed in cytotoxic edema and cause infarction and irreversible tissue damage. DW-MRI can detect this transformation and in addition help also provide information about prognosis of the disease²⁰.

The essential approach in PRES treatment consists of blood pressure and seizure control. If drug-induced cytotoxic involvement is suspected the cessation of drug and treatment of the underlying metabolic disease is crucial⁸. Clinical and radiological findings disappear partially or completely within 2-3 weeks following diagnosis and appropriate treatment. This syndrome is usually benign but can lead to death in patients who are not diagnosed early or treated properly²¹. In our case, neurologic findings recovered and regression of the lesions in cranial MR were observed.

The list of common anticancer and supportive care drugs that can cause PRES is expanding continuously including sunitinib, sorafenib, angiogenesis inhibitors such as bevacizumab and pazopanib. Pazopanib is an oral tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) and c-kit used in the treatment of renal cell carcinoma. The first pazopanib induced PRES case was reported in 2012 followed by few cases with bilaterally involvement. According to the published literature, this is the fifth reported case of PRES associated with pazopanib, but the second one of unilaterally presentation^{17, 22-24}. The treatment of pazopanib was discontinued in all the reported cases but clinical and radiological recovery varied between patients. Therefore, PRES should be considered in patients undergoing treatment with pazopanib (even in the presence of unilateral imaging findings) if they show clinical presentation similar to this syndrome. Also it should be kept in mind that early diagnosis and rapid treatment may help prevent permanent neurological deficits.

REFERENCES

1. Chaves CJ, Appignani B, Breen J, Pao L, Wang A, et al. A reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. *N Engl J Med* 1996;334:494-500. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602223340803>
2. Casey SO, Sampaio RC, Michel E, Truwit CL. Posterior reversible encephalopathy syndrome utility of FLAIR imaging in the detection of cortical and subcortical lesions. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000;21:1119-206.
3. Garq RK. Posterior leukoencephalopathy syndrome. *Postgrad Med J* 2001;77(903):24-8. <https://doi.org/10.1136/pmj.77.903.24>
4. McKinney AM, Short J, Truwit CL, McKinney ZJ, Kozak OS, Karen S, et al. Posterior reversible encephalopathy syndrome: incidence of atypical regions of involvement and imaging findings. *AJR Am J Roentgenol* 2007;189(4):904-12. <https://doi.org/10.2214/AJR.07.2024>
5. Fugate JE, Claassen DO, Cloft HJ, Kallmes DF, Kozak OS, Rabinstein AA. Posterior reversible encephalopathy syndrome: associated clinical and radiologic findings. *Mayo Clin Proc* 2010;85(5):427-32. <https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0590>
6. Hedna VS, Stead LG, Bidari S, Patel A, Gottipati A, Favilla CG, et al. Posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) and CT perfusion changes. *Int J Emerg Med* 2012; 5:12. <https://doi.org/10.1186/1865-1380-5-12>
7. Tarım E, Giray S. Reversible Encephalopathy Syndrome (PRES) in the Differential Diagnosis of Eclampsia: Case Report. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst* 2011;21(3): 213-5.
8. Legriel S, Pico F, Azoulay E. Understanding Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome. *Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine* 2011;631-53. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18081-1_56
9. Tekşan M, Casey SO, Michel E, Truwit CL. Posterior reversible ensefalopati sendromu: patofizyoloji ve ileri MRG teknikleri ile korelasyon. *Tanışal ve Girişimsel Radyoloji* 2001;7:464-72.
10. Demirtaş Ö, Gelal F, Vidinli BD, Demirtaş LO, Uluç E, Baloglu A. Cranial MR imaging with clinical correlation in preeclampsia and eclampsia. *Diagn Interv Radiol* 2005; 11:189-94.
11. McKinney AM, Short J, Truwit CL, McKinney ZJ, Kozak OS, Santa Cruz KS, et al. Posterior reversible encephalopathy syndrome: incidence of atypical regions of involvement and imaging findings. *Am J Roent* 2007;189:904-12. <https://doi.org/10.2214/AJR.07.2024>
12. Sharma A, Whitesell RT, Moran KJ. Imaging pattern of intracranial hemorrhage in the setting of posterior reversible encephalopathy syndrome. *Neuroradiology* 2009. <https://doi.org/10.1007/s00234-009-0632-6>
13. Ergün T, Lakadamyalı H, Yılmaz A. Recurrent posterior reversible encephalopathy syndrome in a hypertensive patient with end-stage renal disease. *Diagn Interv Radiol* 2008; 14:182-5.
14. Hagemann G, Ugur T, Witte OW, Fitzek C. Recurrent posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES). *J Hum Hypertens* 2004;18:287-9. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001664>
15. Bartynski WS, Boardman JF, Zeigler ZR, Shaddock RK,

- Lister J.* Posterior reversible encephalopathy syndrome in infection, sepsis, and shock. *Am J Neuroradiol.* 2006; 27:2179-2190.
16. *Bartynski WS, Tan HP, Boardman JF, Shapiro R, Marsh JW.* Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome after Solid Organ Transplantation. *Am J Neuroradiol.* 2008; 29:924-930.
<https://doi.org/10.3174/ajnr.A0960>
 17. *Chelis L, Souftas V, Amarantidis K, Xenidis N, Chamalidou E, Dimopoulos P, et al.* Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome induced by pazopanib. *BMC Cancer* 2012;12:489.
 18. *Bartynski WS.* Posterior reversible encephalopathy syndrome, part 2: controversies surrounding pathophysiology of vasogenic edema. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29(6): 1043-9.
<https://doi.org/10.3174/ajnr.A0929>
 19. *Doelken M, Lanz S, Rennert J, Alibek S, Richter G, Doerfler A.* Differentiation of cytotoxic and vasogenic edema in a patient with reversible posterior leukoencephalopathy syndrome using diffusion-weighted MRI. *Diagn Interv Radiol* 2007;13:125-8.
 20. *Covarrubias DJ, Luetmer PH, Campeau NG.* Posterior reversible encephalopathy syndrome: prognostic utility of quantitative diffusion-weighted MR images. *AJNR AmJ Neuroradiol* 2002;23:1038-48.
 21. *Abenza-Abildua MJ, Fuentes B, Diaz D, Royo A, Olea T, Aguilar-Amat MJ, et al.* Cyclophosphamide-induced reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. *BMJ Case Rep* 2009;2009.
 22. *Asaithambi G, Peters BR, Hurliman E, Moran BP, Khan AS, Taylor RA.* Posterior reversibl encephalopathy syndrome induced pazopanib. *BMC Cancer* 2012;12(1):489.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-489>
 23. *Foerster R, Welzel T, Debus J, Gruellich C, Jaeger D, Potthoff K.* Posterior reversibl leukoencephalopathy syndrome associated with pazopanib. *Case Rep Oncol* 2013; 6(1):204-8.
<https://doi.org/10.1159/000350742>
 24. *Miaris N, Maltezou M, Papaxoinis G, Visvikis A, Samantas E.* Posterior reversibl encephalopathy syndrome with concurrent nephritic syndrome in a patient treated with pazopanib for metastatic renal cell carcinoma: case report and review of the literature. *Clin Genitourinary Cancer* 2016; pii:S1558-7673(16)30239-7.
<https://doi.org/10.1016/j.clgc.2016.08.005>